



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

**Cuantificación de bacterias ácido lácticas por reacción
en cadena de la polimerasa en tiempo real en la
fermentación controlada de *Capsicum frutescens*, ají
“charapita”**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Abad HURTADO GOMEZ

ASESOR

Amparo Iris ZA VALETA PESANTES

Carlos Alfredo VEGAS PÉREZ

Lima, Perú

2017



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Hurtado A. Cuantificación de bacterias ácido lácticas por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real en la fermentación controlada de *Capsicum frutescens*, ají “charapita” [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2017.



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Decanato



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

"Cuantificación de bacterias ácido lácticas por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real en la fermentación controlada de *Capsicum frutescens*, aji "charapita" /"

Que presenta el Bachiller en Farmacia y Bioquímica:

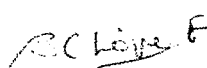
ABAD HURTADO GOMEZ

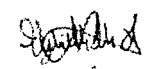
Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

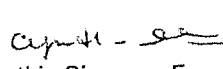
Diecinueve (19) Con Mención

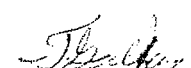
en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico(a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 14 de setiembre de 2017.


Q.F. Benedicta Carmen López Flores
Presidente


Mg. Elizabeth Liz Chávez Hidalgo
Miembro


Mg. Cynthia Giovanna Esquerre Huallpa
Miembro


Q.F. Teresa Celina Gallardo Jugo
Miembro

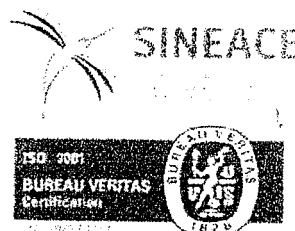
"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jr. Puno N° 1002, Jardín Botánico - Lima I - Perú

Teléfonos: (511) 328-4737 / (511) 679-7000 anexo 4826 Ap. Postal 4559 - Lima I

E-mail: decanofyb@unmsm.edu.pe

<http://farmacia.unmsm.edu.pe>



DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi familia, quienes de manera incondicional
me brindaron su apoyo para concluir esta tesis.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra Amparo Zavaleta, por la confianza puesta en mí, por compartir sus conocimientos y por el apoyo anímico en momentos difíciles durante la realización de esta tesis.

A mi co-asesor, el Dr. Carlos Alfredo Vegas Pérez por haberme brindado su conocimiento científico y su constante asesoramiento para concluir exitosamente esta tesis.

A mis amigos, miembros del laboratorio de Biología Molecular, Johanna, Stephy, Susana, Omar, Diego, Arturo, Elizabeth, Carmen, Karim, Nathali, Cindy, Guadalupe y Estela quienes hicieron mi estancia una experiencia inolvidable.

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, con el financiamiento del Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad Innóvate Perú, Contrato 230-FINCyT-IA-2013.

ÍNDICE

	Páginas
RESUMEN.....	12
SUMMARY.....	13
1 INTRODUCCIÓN.....	14
2 OBJETIVOS.....	15
3 MARCO TEÓRICO	16
3.1 Ajíes	16
3.1.1 Clasificación taxonómica del género <i>Capsicum</i>	16
3.1.2 Composición química del ají “charapita”	17
3.1.3 Usos	18
3.2 Fermentación	19
3.2.1 Fermentación de los alimentos	19
3.2.2 Fermentación ácido láctica	22
3.2.3 Bacterias ácido lácticas (BAL)	23
3.2.4 FAL espontánea vs controlada	24
3.3 Cuantificación de microorganismos	26
3.3.1 Métodos tradicionales.....	26
3.3.1.1 Recuento por microscopio.....	26
3.3.1.2 Recuento de colonias por placas	26
3.3.2 Métodos modernos	27
3.3.2.1 Epifluorescencia directa	27
3.3.2.2 Hibridación fluorescente in situ (FISH)	27
3.3.2.3 Citometría de flujo (FC)	29
3.3.2.4 Impedancia.....	30
3.3.2.5 PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR)	31
4 METODOLOGÍA	36
4.1 Optimización de la cuantificación de BAL por qPCR.....	36
4.1.1 Cepas de BAL.....	36
4.1.2 Especificidad de los primers	37
4.1.3 Preparación del medio que simula las condiciones de fermentación controlada	38

4.1.4	Curva de crecimiento.....	38
4.1.5	Extracción de ADN genómico.....	39
4.1.6	Elaboración de la curva estándar	39
4.2	Preparación de la fermentación	40
4.3	Muestreo de la fermentación controlada	42
4.3.1	Análisis fisicoquímicos.....	42
4.3.2	Análisis microbiológicos.....	42
4.3.3	Cuantificación de BAL por qPCR.....	43
4.4	Análisis estadístico.....	43
5	RESULTADOS	44
5.1	Optimización de la técnica de cuantificación de BAL por qPCR	44
5.1.1	Especificidad de los primers frente a BAL nativas de la Región Loreto.....	44
5.1.2	Curva de crecimiento.....	44
5.1.3	Elaboración de la curva estándar de <i>L. plantarum</i> ATCC 14917 ..	46
5.2	Fermentación controlada del ají “charapita” a escala piloto	48
5.2.1	Análisis fisicoquímicos.....	48
5.2.2	Análisis microbiológicos y cuantificación de BAL por qPCR.....	49
6	DISCUSIÓN.....	51
7	CONCLUSIONES	56
8	RECOMENDACIONES.....	57
9	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
10	ANEXOS.....	65
10.1	Anexo. Metodología	66
10.2	Anexo. Resultado.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
BAL	Bacterias ácido lácticas
cel.mL ⁻¹	Células por mililitro
CT	Ciclo umbral
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfatados
<i>E</i>	Eficiencia
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FAL	Fermentación ácido láctica
g/L	Gramos sobre litro
<i>L</i>	<i>Lactobacillus</i>
Log	Logaritmo
MRS	Man, rogosa y sharpe
mM	Milimolar
min	Minutos
NaCl	Cloruro de sodio
pb	Pares de bases
p/v	Peso sobre volumen
pH	Potencial de hidrógeno
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	PCR en tiempo real o PCR cuantitativa
RT-PCR	PCR con transcripción inversa

RPM	Revoluciones por minuto
r^2	Coeficiente de correlación
SE	Error estándar
S	Pendiente
seg	Segundo
TBE	Buffer formado por tris, borato y EDTA
TE	Buffer formado por tris y EDTA
UV	Ultravioleta
UFC.mL ⁻¹	Unidades formadoras de colonia por mililitro
V/V	Volumen sobre volumen
μL	Microlitros
μM	Micromolar

ÍNDICE DE TABLAS

	Páginas
Tabla 1. Clasificación taxonómica del género <i>Capsicum</i>	16
Tabla 2. Principales ajíes cultivados en Perú	17
Tabla 3. Composición química del ají “charapita”	18
Tabla 4. Microorganismos que fermentan diversos alimentos.....	20
Tabla 5. Productos fermentados, país y consumo promedio anual.....	21
Tabla 6. BAL productoras de sustancias químicas beneficiosas para el hombre y la calidad del alimento	24
Tabla 7. Cepas de BAL usadas en este estudio.....	36
Tabla 8. Coeficientes de correlación (r^2), pendientes (S) y eficiencias (E) de curvas estándar obtenidas a partir de los medios MRS y fermentación formulado	48
Tabla 9. FAL controlada del ají “charapita” y cuantificación de la población por microscopio, viables en medio MRS y qPCR	50

ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. FAL homofermentativa y heterofermentativa	22
Figura 2. Esquema que representa la relación entre los microorganismos, alimento fermentado y el consumidor.....	25
Figura 3. Diagrama de flujo de FISH	28
Figura 4. Detección diferencial de Lactobacillus por FISH	29
Figura 5. Principio general de la citometría de flujo.....	30
Figura 6. Curvas de amplificación en qPCR.....	31
Figura 7. Mecanismos de detección con SYBR Green I	32
Figura 8. Curva de temperatura de disociación del ADN	33
Figura 9. Sondas de hibridación específica.....	34
Figura 10. Protocolo de la microextracción de ADN genómico de BAL.....	37
Figura 11. Protocolo de extracción de ADN genómico.....	39
Figura 12. Flujograma de la elaboración de la fermentación controlada del ají “charapita”	41

Figura 13. Amplificación de ADN utilizando primers universales WLAB1 y WLAB2. Carriles del B1 al B12 corresponden a cepas de BAL. M1, marcador ladder de 100 pb	44
Figura 14. Cinética de crecimiento de <i>L. plantarum</i> ATCC 14917 en medio MRS	45
Figura 15. Curva estándar obtenida por qPCR a partir de diluciones seriadas de ADN genómico de <i>L. plantarum</i> ATCC 14917.....	47
Figura 16. Análisis fisicoquímicos de azúcares reductores, pH y Acidez total titulable durante la fermentación controlada del ají “charapita”	49

RESUMEN

PCR en tiempo real (qPCR), es una técnica de detección y cuantificación de genes y células. Las ventajas de esta técnica son: Gran sensibilidad, rapidez y confiabilidad. Así, se puede obtener un buen control de los bioprocesos. El objetivo de esta investigación fue determinar la dinámica poblacional de BAL en la fermentación controlada de *Capsicum frutescens*, ají "charapita" por qPCR y los métodos tradicionales. Previamente, se determinó la especificidad de los cebadores WLAB1 y WLAB2 con cepas BAL aisladas de frutos de la Región Loreto, así como se elaboró una curva estándar de *L. plantarum* ATCC 14917 a partir del cultivo en medio MRS y fermentación formulado para determinar los límites de detección de la qPCR. Durante la fermentación, se realizaron análisis microbiológicos para enumerar las BAL por recuento en microscopio, placa y qPCR. Así mismo, se determinaron los azúcares reductores, acidez total titulable y pH. Los recuentos de BAL por microscopía y qPCR fueron similares durante la fermentación. Sin embargo, el recuento de colonias en agar MRS fue menor a los obtenidos con las otras técnicas empleadas. En conclusión, qPCR permitió detectar y cuantificar BAL en la fermentación controlada de chile "charapita".

Palabras clave: qPCR, Bacterias ácido lácticas, fermentación controlada, *Capsicum frutescens*.

SUMMARY

PCR in real time (qPCR), is a detection and quantification technique of genes and cells. The advantages of this technique are great sensitivity, speed and reliability. So, it could get a good control of the bioprocesses. The objective of this investigation was to determine the population dynamics of LAB in the controlled fermentation of *Capsicum frutescens*, "charapita" chili by qPCR and traditional methods. Previously, specificity of WLAB1 and WLAB2 primers with BAL strains isolated from Loreto Region fruits was determined, as well as it was developed a standard bend of *L. plantarum* ATCC 14917 from the culture in MRS medium and fermentation formulated to determine the bounds of qPCR detection. During the fermentation, microbiologic analysis were realized to enumerate BAL by microscope, plate and qPCR. Also, reducers sugars, total tritatable acidity and pH were determined. BAL counts by microscopy and qPCR were similar during the fermentation. However, the count of strains in MRS agar was less than the obtained with other techniques. In conclusion, qPCR allowed detecting and counting BAL in the controlled fermentation of "charapita" chili.

Key words: qPCR, lactic acid bacteria, controlled fermentation, *Capsicum frutescens*.

1 INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) participan en la fermentación ácido láctica (FAL) de los alimentos, produciendo metabolitos que contribuyen a la mejora de la calidad del alimento. Por lo tanto, es necesario contar con herramientas o técnicas que permitan detectar y cuantificar poblaciones de BAL de manera rápida durante la fermentación, con la finalidad de tener un mayor control microbiológico del proceso. Sin embargo, las técnicas convencionales de cuantificación microbiana como el recuento de células viables en placas son lentos, laboriosos y presentan problemas de cultivabilidad, especialmente aquellas procedentes de la fermentación.

Actualmente, existen técnicas modernas para la detección y cuantificación de los microorganismos que participan en la fermentación, de las cuales la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) es una alternativa por su gran sensibilidad, especificidad y rapidez.

En tal sentido, el propósito de este estudio fue detectar y cuantificar las BAL por qPCR usando “SYBR Green” en la fermentación controlada del ají “charapita” y se la comparó con técnicas tradicionales de recuento por microscopio y en placas.

2 OBJETIVOS

General

- Determinar la dinámica poblacional de las bacterias ácido lácticas en la fermentación controlada de *Capsicum frutescens*, del ají “charapita” por PCR en tiempo real y los métodos tradicionales.

Específicos

1. Analizar la fermentación controlada del ají “charapita” con los parámetros fisicoquímicos de azúcares reductores, pH y acidez.
2. Optimizar la PCR en tiempo real para la cuantificación de bacterias ácido lácticas en la fermentación controlada del ají “charapita”.
3. Cuantificar las bacterias ácido lácticas durante la fermentación controlada del ají “charapita” por qPCR, y recuento por microscopio y recuento en placas.

3 MARCO TEÓRICO

3.1 Ajíes

El ají también conocido como uchu, chile o pimienta pertenece al género *Capsicum*. El origen de los ajíes es probablemente el Alto Perú, zona que incluye la cuenca del lago Titicaca y lo que hoy es Bolivia⁽¹⁾. Desde la antigüedad los ajíes se usaron como alimento y emblema de arte y religión.

3.1.1 Clasificación taxonómica del género *Capsicum*

Tabla 1. Clasificación taxonómica del género *Capsicum*

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase	<i>Asteridae</i>
Orden	<i>Solanales</i>
Familia	<i>Solanaceae</i>
Subfamilia	<i>Solanoideae</i>
Género	<i>Capsicum L.</i>

Fuente. Rengifo⁽²⁾

El género *Capsicum* (*C*) agrupa más de 30 especies, de las cuales *C. baccatum*, *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens* y *C. pubescens* son domesticadas y cultivadas en diferentes partes del mundo⁽³⁾. Perú probablemente cuente la mayor diversidad nativa de *Capsicum* cultivado en el mundo. Al respecto, la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), el Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) e instituciones regionales han hecho estudios sobre la

diversidad de los ajíes en Perú, pero aún falta la sistematización sobre los ajíes existentes ⁽¹⁾.

Tabla 2. Principales ajíes cultivados en Perú

Especie	Nombre común	Región
<i>C. annuum</i>	Cerezo	Lambayeque
<i>C. baccatum</i> var. <i>Pendulum</i>	Escabeche, amarillo (fresco)	Cajamarca
	Mirasol (seco)	Costa, sur de Lambayeque
	Pacae	Arequipa, Moquegua, Tacna
	Cacho de cabra o de venado	Lambayeque
	Ayuclo	Selva central, San Martín
<i>C. chinense</i>	Panca, especial, colorado	Costa central y sur
	Limo (paringo, miscucho, etc.)	Costa, sur de Lambayeque
	Mochero	La libertad
	Ají dulce	Amazonía
<i>C. frutescens</i>	Pipi de mono	Cosmopolita, costa y selva
	Charapita	Amazonía, San Martín
	Arnaucho	Norte chico
<i>C. pubescens</i>	Rocoto, locoto	Sierra, selva central

Fuente. APEGA y col. ⁽¹⁾

Capsicum frutescens, es un arbusto de aproximadamente un metro de altura, cultivado principalmente en el Centro y Sur de América. Una de las variedades representativas de la especie, es el ají “charapita” cuyo cultivo es extenso en nuestra Amazonía peruana. El fruto es picante, aromático y de color amarillo^(2,4).

3.1.2 Composición química del ají “charapita”

La capsaicina compuesto fenólico, es el principal componente del ají “charapita”, este es un compuesto fenólico responsable del ardor del fruto. Además, contiene vitaminas y sales en pequeñas cantidades (tabla 3). La composición química del ají “charapita” depende de la zona geográfica, suelo, clima, así como tiempo de cultivo y cosecha ⁽⁵⁾.

Tabla 3. Composición química del ají “charapita”

Compuesto químico	Concentración por 100 g
Agua (g)	81,1
Carbohidratos totales (g)	10,9
Grasa (g)	9,2
Proteínas totales (g)	1,8
Capsaicinoides (mg)	576,6
Flavonoides (mg)	2,5
Quercetina (mg)	2,5
Fósforo mg	65
Hierro (mg)	1,3
Calcio (mg)	77
Vitamina A (ug ER)	228
Vitamina C (mg)	104
Vitamina E (mg)	11,5
Tiamina (mg)	0,07
Riboflavininas (mg)	0,2
Niacina (mg)	1,6

Fuente. Rengifo y col. ⁽²⁾, Libreros y col. ⁽⁵⁾

3.1.3 Usos

El ají “charapita” es utilizado como saborizante y condimento en la gastronomía de la Región Amazónica, en la elaboración de comidas tales como: patashca, patacones, tacacho, juane, ceviches, sazonar paiche⁽²⁾. Además, el fruto es utilizado contra la parasitosis intestinal, manchas de la piel y el reumatismo⁽⁶⁾.

3.2 Fermentación

3.2.1 Fermentación de los alimentos

La fermentación existe antes que la humanidad tuviera conocimiento de los microorganismos que participan en ella, es el proceso biotecnológico más antiguo^(7, 8). Louis Pasteur, en el siglo XIX, la describió como *la vie sans l'air* (la vida sin el aire). Sin embargo, a partir de la década 1970, el consumo de los alimentos fermentados está en constante crecimiento⁽⁹⁾.

La fermentación se define como un proceso donde los microorganismos anaerobios o anaerobios facultativos son partícipes de la conversión de un sustrato (azúcar) en producto. Existen muchos microorganismos responsables de la producción de diversos metabolitos de interés industrial. En la tabla 4 se mencionan algunos microorganismos que participan en la fermentación de diversos alimentos.

Tabla 4. Microorganismos que fermentan diversos alimentos

Alimento (sustrato)	Microorganismos	Producto
Cerdo	<i>L. sake</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. plantarum</i>	Chorizo
Leche animal	<i>Strep. thermophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>Bifidobacterium</i> spp.	Yogur
Leche de cabra, oveja o vaca	<i>L. brevis</i> , <i>L. caucasicus</i> , <i>Strep. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Tor. holmii</i> , <i>Tor. Delbrueckii</i>	Kéfir
Col, cebolla verde, pimienta picante, jengibre	<i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>Leuc. citreum</i> , <i>Leuc. gasicomitatum</i> , <i>Leuc. kimchii</i> , <i>Leuc. inhae</i> , <i>W. koreensis</i> , <i>W. kimchii</i> , <i>W. cibaria</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. sakei</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Candida</i> , <i>Halococcus</i> , <i>Haloterrigena</i> , <i>Kluyveromyces</i> , <i>Lodderomyces</i> , <i>Natrialba</i> , <i>Natronococcus</i> , <i>Pichia</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Sporisorium</i> y <i>Trichosporon</i>	Kimchi
Repollo	<i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>Ped. pentosaceus</i> ; <i>L. brevis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. sakei</i>	Chucrut
Harina de trigo	<i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. alimentarius</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. delbrueckii</i>	Masa fermentada para el pan
Maíz	<i>S. cerevisiae</i> , <i>S. apiculata</i> , <i>S. pastorianus</i> , y especies de <i>Lactobacillus</i> y <i>Acetobacter</i> .	Chicha
Uva	<i>Candida colliculosa</i> , <i>C. stellata</i> , <i>Hanseniaspora uvarum</i> , <i>Kl. apiculata</i> , <i>Kl. thermotolerans</i> , <i>Torulaspora delbrueckii</i> , <i>Metschnikowia pulcherrima</i> , <i>Candida</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp y <i>S. cerevisiae</i> .	Vino
Aceituna	<i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>Ped. Pentosaceus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. pentosus</i> / <i>L. plantarum</i> , <i>L. paracollinoides</i> , <i>L. vacinostercus</i> / <i>L. suebicus</i> , <i>Gordonia</i> sp./ <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Halorubrum orientalis</i> , <i>Halosarcina pálida</i> , <i>Sphingomonas</i> sp./ <i>Sphingobium</i> sp, <i>Candida</i> cf. <i>apicola</i> , <i>Pichia</i> sp., <i>S. cerevisiae</i> .	Aceitunas fermentadas

L., *Lactobacillus*; *Tor.*, *Torulopsis*; *Ped.*, *Pediococcus*; *Leuc.*, *Leuconostoc*; *W.*, *Weisella*; *S.*, *Sacharomyces*; *Kl.*, *Kloeckera*.

Fuente. Tamang y col.⁽¹⁰⁾

En la actualidad, los alimentos fermentados se dividen en nueve grupos principales según la materia prima a fermentar (animal o vegetal): (1) cereales, (2) verduras y brotes de bambú, (3) legumbres, (4) raíces / tubérculos, (5) leche, (6) carnes, (7) pescado seco y ahumado, (8) productos diversos, y (9) bebidas alcohólicas⁽¹⁰⁾.

La demanda de alimentos obtenidos por fermentación natural tiene mucha aceptación debido principalmente a diversos efectos beneficiosos para la salud. En la tabla 5 se muestra los principales productos fermentados y el país donde son consumidos.

Tabla 5. Productos fermentados, país y consumo promedio anual

Producto fermentado	País	Consumo promedio anual (por persona)
Cerveza	Alemania	106 L
Vino	Italia,	90 L
	Portugal	
	Argentina	70 L
	Finlandia	40 L
Yogur	Países Bajos	25 L
Salsa de soja	Japón	10 L
kimchi	Corea	22 kg
Tempeh	Indonesia	18 kg
Queso	Reino Unido	10 kg
Miso	Japón	7 kg

Fuente. Chilton y col.⁽¹¹⁾

3.2.2 Fermentación ácido láctica

La fermentación ácido láctica (FAL) consiste en la producción de ácido láctico (FAL homofermentativa) como principal producto, y otros ácidos (FAL heterofermentativa) a partir de azúcares como sustratos de la vía anaeróbica.

En la FAL homofermentativa se produce ácido láctico, mientras que en la heterofermentativa se obtiene ácido láctico, CO₂ y etanol (figura 1).

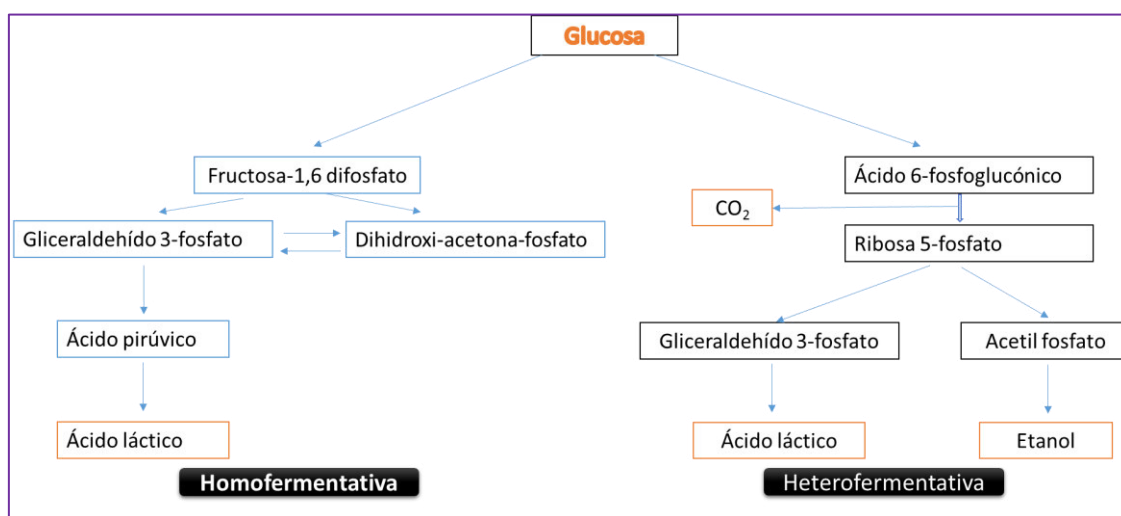


Figura 1. FAL homofermentativa y heterofermentativa

La FAL es realizada principalmente por las BAL que pueden estar presentes en la materia prima, en el ambiente y/o en los contenedores donde se desarrolla la fermentación. Además, la FAL ha ganado creciente atención como biopreservante.

En consecuencia, los beneficios de la FAL en los alimentos son: mejorar su vida útil, aumentar su valor nutritivo (síntesis de vitaminas, aminoácidos esenciales y proteínas y degrada factores antinutrientes), mejorar sus características organolépticas, brindar textura y seguridad al alimento con la producción de

ácido láctico, bacteriocinas y CO₂ que inhiben a los microorganismos patógenos⁽¹²⁻¹⁴⁾.

3.2.3 Bacterias ácido lácticas (BAL)

Las BAL presentan una serie de características comunes tales como ser Gram positivas, bacilos o cocos no formadores de esporas; la mayoría son anaerobios aerotolerantes carentes de citocromos y porfirinas; por lo tanto, son catalasa y oxidasa negativos⁽⁸⁾.

Los principales géneros de BAL son: *Alkalibacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*. Todos estos géneros fueron aislados de diversos alimentos y bebidas fermentadas en diferentes países⁽¹⁰⁾.

Las BAL producen frecuentemente ácidos orgánicos, bacteriocinas, peróxido de hidrógeno, etanol, diacetilo, los cuales inhiben el crecimiento de microorganismos contaminantes o adulterantes por disminución del pH e incremento de sustancias antimicrobianas ^(7, 8). Por otro lado, muchas BAL son productoras de sustancias químicas beneficiosas para el hombre y la calidad del alimento fermentado (tabla 6).

Tabla 6. BAL productoras de sustancias químicas beneficiosas para el hombre y la calidad del alimento

Sustancias químicas	Microorganismos
✓ Ácido linoleico conjugado (CLA)	<i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , y <i>Bifidobacterium</i>
✓ Exopolisacáridos (EPS)	<i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>Bifidobacterium</i>
✓ Oligosacáridos	<i>Bifidobacterium</i> y <i>Lactobacillus</i>
✓ Vitaminas (B12, biotina y ácido fólico)	<i>L. plantarum</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> y <i>Propionibacterium</i>
✓ Ácido gamma-aminobutírico (GABA)	<i>Lactococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Streptococcus</i> y <i>Leuconostoc</i>
✓ Péptidos con actividad:	
• Inmunomoduladora	<i>L. rhamnosus</i> GG
• Antihipertensiva	<i>L. rhamnosus</i> GG, <i>L. helveticus</i> y <i>S. thermophilus</i>
• Antimicrobiana	<i>L. helveticus</i> y <i>L. acidophilus</i>
• Antioxidante	<i>Bifidobacterium longum</i> y <i>L. delbrueckii</i>
✓ Bacteriocinas	<i>Lactococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Bifidobacterium</i> y <i>Leuconostoc</i>

Fuente. Fernández y col.⁽¹⁴⁾

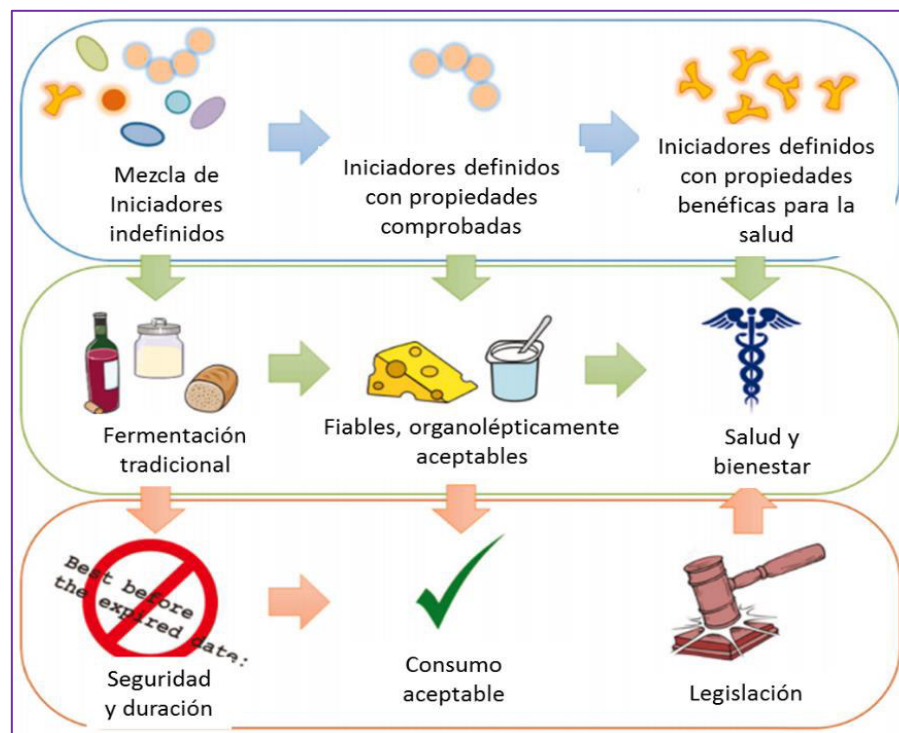
3.2.4 FAL espontánea vs controlada

La fermentación espontánea se realiza con la microbiota natural, en la mayoría de casos, se desconoce su composición microbiana y por lo tanto puede existir riesgos de contaminación por la presencia de agentes patógenos o adulterantes que afectan la calidad sensorial y microbiológica del alimento fermentado. En consecuencia, la fermentación controlada es una de las alternativas prometedoras en las fermentaciones de los alimentos^(12, 15).

Los criterios de selección de los cultivos iniciadores para la fermentación controlada depende principalmente de la capacidad de adaptarse a las

condiciones de la fermentación (pH, temperatura, sustrato), la producción de otros metabolitos y compuestos antimicrobianos, entre otros ⁽¹⁵⁾.

En la actualidad, la fermentación controlada es un bioproceso empírico para las características deseadas del producto final. La compleja relación de los microorganismos puede fácilmente alterar la calidad del producto final^(12, 13).



Fuente. Hill y col.⁽¹³⁾

Figura 2. Esquema que representa la relación entre los microorganismos, alimento fermentado y el consumidor

La tendencia actual es el uso de microorganismos identificados con características definidas para la obtención de alimentos fermentados de mayor calidad. Para lo cual, las técnicas modernas deben facilitar la identificación y cuantificación de los microorganismos con la finalidad de acelerar la calidad y comercio de los alimentos fermentados.

3.3 Cuantificación de microorganismos

3.3.1 Métodos tradicionales

3.3.1.1 Recuento por microscopio

Es un método preliminar que sirve para determinar las características de los microorganismos como su morfología, motilidad y esporas presentes en un alimento permitiendo obtener datos preliminares del tipo de microorganismo predominante. También, facilita hacer una enumeración rápida y directa de los microorganismos mediante un dispositivo de recuento (por ejemplo, cámara de Neubauer). Sin embargo, las células viables y muertas no se diferencian por este método. Además, una muestra debe contener 10^5 cel.mL⁻¹ de microorganismos como mínimo para un uso eficaz de este método. A la vez, las muestras de alimentos que presenten partículas pueden interferir en la enumeración de los microorganismos^(7, 8).

3.3.1.2 Recuento de colonias por placas

La cuantificación de microorganismos es realizada tradicionalmente mediante el uso del cultivo en placas con medios selectivos y no selectivos. Este se fundamenta en la formación de una colonia a partir de una cepa viable cultivable, de esta manera se podría cuantificar la población bacteriana en el alimento. Esta técnica, no es capaz de cuantificar a las bacterias viables pero no cultivables. Además, las bacterias subletalmente dañadas son difícilmente recuperables en las placas con agar selectivo^(7, 8). Algunos ejemplos de medios de cultivos para cuantificación de BAL son: recuento de aerobios totales en medio PCA (plate count agar), *Lactobacillus termófilo* en medio MRS (Man, Rogosa y Sharpe), *Leuconostoc sp.* en medio MSE (Mayeux, Sandine y Elliker)⁽¹⁶⁾, etc. Sin embargo, estas técnicas difícilmente llegan a nivel de especie, se necesita mucho tiempo,

personal y son muy laboriosas⁽¹²⁾. Además, aquellas bacterias que forman cadenas y exopolisacáridos generalmente son omitidas por UFC (unidades formadoras de colonias).

3.3.2 Métodos modernos

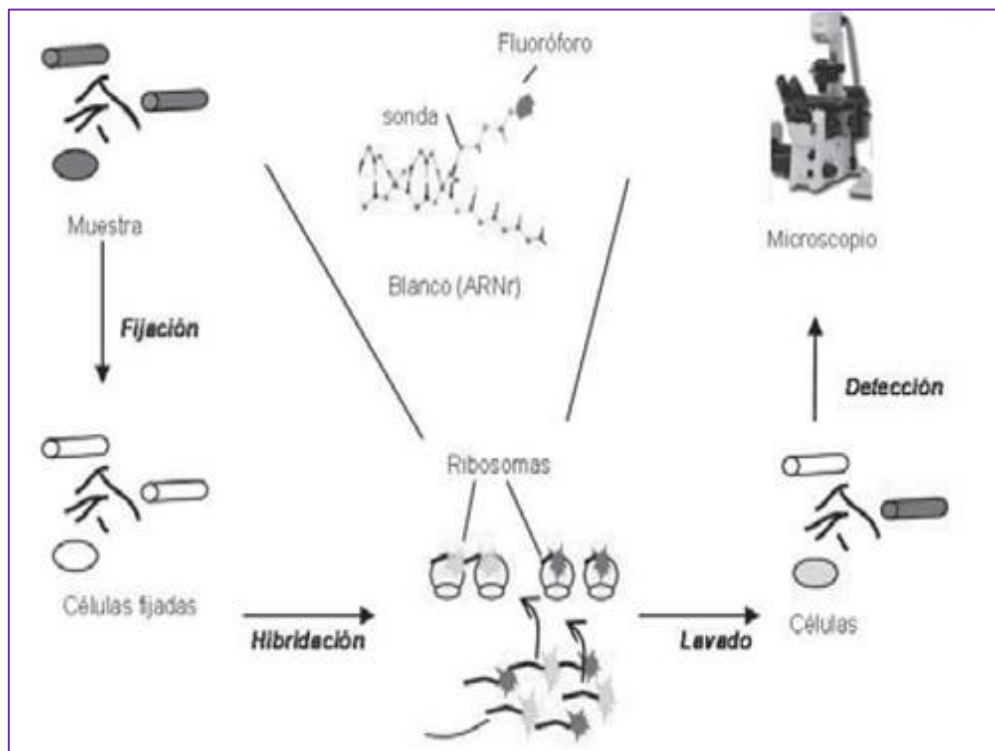
3.3.2.1 Epifluorescencia directa

La epifluorescencia directa es un método adecuado para la enumeración de bacterias totales en muestras ambientales⁽¹⁷⁾, permite cuantificar células viables y no viables de manera simultánea, usa marcadores fluorescentes con diferencias espectrales. Esta diferencia de coloración se observa por microscopio. El set de reactivos LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability kit (Molecular probes - Invitrogen) permite estimar la viabilidad, contiene dos tipos de fluorescentes: el SYTO9 y el yoduro de propidio. El primero tiñe todas las células y el segundo penetra la membrana citoplasmática causando la reducción de la intensidad fluorescente del SYTO9. Las células que presentan la membrana intacta se tiñen de verde (viables) y las dañadas (no viables) de rojo^(18, 19).

3.3.2.2 Hibridación fluorescente in situ (FISH)

Esta técnica, permite una rápida enumeración de BAL mediante el análisis de la imagen digital obtenida con la ayuda de un microscopio de fluorescencia⁽⁹⁾, emplea sondas específicas de ADN marcadas por fluorescencia que hibridan con el género o especie a determinar⁽²⁰⁾. La detección se realiza por microscopia de fluorescencia o citometría de flujo. La principal ventaja de esta técnica es que permite identificar y cuantificar de forma rápida y directa los microorganismos sin cultivo ni extracción de ADN. Sin embargo, los principales inconvenientes son su alto costo y la interferencia de algunos compuestos como polisacáridos,

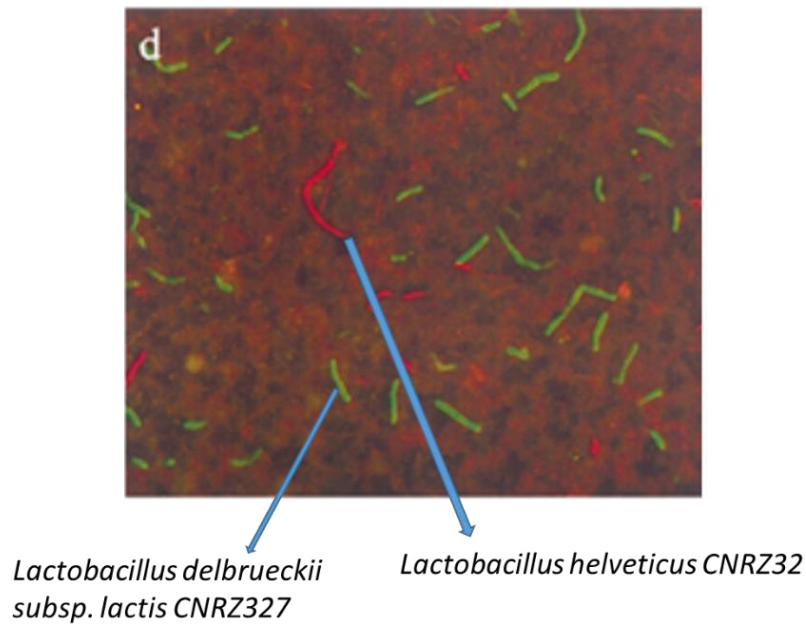
compuestos fenólicos presentes en la muestra⁽¹⁸⁾. Así mismo, el uso del microscopio influye en la sensibilidad⁽⁹⁾.



Fuente: Martínez, R.⁽²⁰⁾

Figura 3. Diagrama de flujo de FISH

FISH ha sido utilizada para la cuantificación de BAL viables en vinos, leche y alimentos fermentados^(21, 22). En la figura 4 se observa dos especies de *Lactobacillus* en leche, los marcadores usados fueron ADN marcado con fluoresceína (fluorescente) y ADN marcado con rodamina (rojo), el primero hibrida con el ARNr de *L. delbrueckii* y el segundo con el de *L. helveticus*.

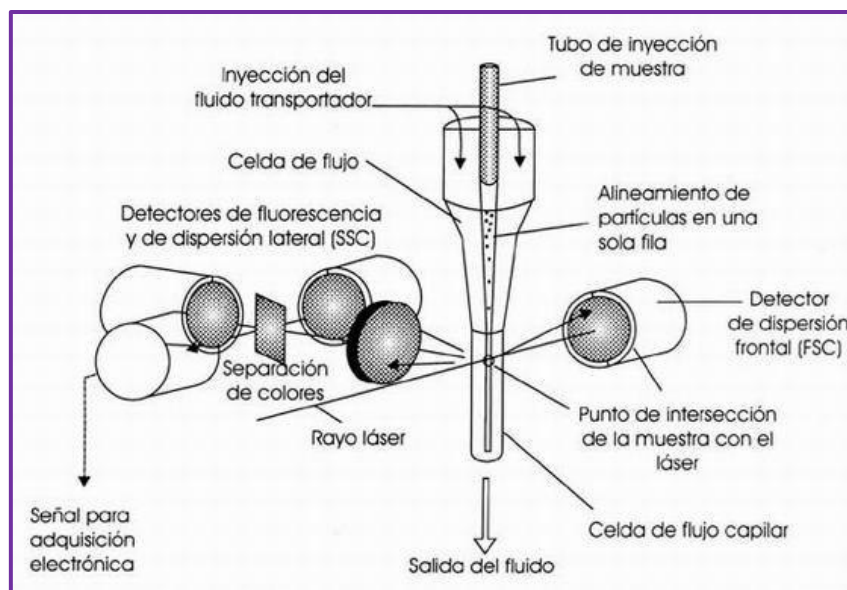


Fuente. Matte-Tailliez y col.⁽²²⁾

Figura 4. Detección diferencial de *Lactobacillus* por FISH

3.3.2.3 Citometría de flujo (FC)

La FC permite la medición y el análisis multiparamétrico (varios parámetros a la vez) simultáneo de características físicas y / o químicas de hasta miles de partículas por segundo. Las propiedades medidas incluyen el tamaño relativo de una partícula, granularidad relativa o complejidad interna, e intensidad de fluorescencia relativa. Además, las células son marcadas con sondas fluorescentes y se hacen pasar a través de luz láser, el cual provoca la excitación de los fluorescentes y a la vez emite luz a diferentes longitudes. En el mercado existe una variedad de sondas fluorescentes dirigidas para determinar la integridad de la membrana celular, actividad enzimática intracelular, pH citoplasmático y el potencial de membrana, todos los cuales proporcionan una medida de la viabilidad bacteriana⁽⁹⁾.



Fuente. Barrera y col.⁽²³⁾

Figura 5. Principio general de la citometría de flujo

Esta técnica ha sido utilizada para la cuantificación de BAL viables y no viables en cultivos iniciadores en la fermentación de la leche (Bunthof y col., 2001; Bensch y col., 2014; y He y col., 2017)⁽²⁴⁻²⁶⁾

3.3.2.4 Impedancia

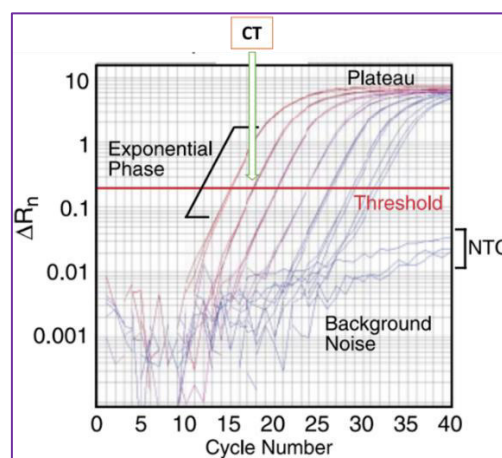
La microbiología de impedancia es un método fácil y rápido que permite el rastreo cualitativo y cuantitativo de microorganismos midiendo el cambio en la conductividad eléctrica. En la microbiología, se define como la resistencia al flujo de una corriente alterna que pasa a través de un medio de crecimiento microbiano conductor⁽²⁷⁾. Durante el crecimiento microbiano, los procesos metabólicos producen cambios eléctricamente medibles en el medio de crecimiento debido al metabolismo de nutrientes de alto peso molecular (proteínas, carbohidratos, etc.) en componentes iónicos cargados más pequeños (aminoácidos, ácidos orgánicos, etc.) que aumentan la conductividad eléctrica del medio⁽²⁸⁾. Este cambio de conductividad es proporcional al cambio del

número de microorganismos. Sin embargo, el principal problema es que no puede cuantificar individualmente los diferentes microorganismos en una muestra⁽²⁹⁾.

A pesar de que esta técnica se utiliza desde los años setenta, la aplicación en la industria alimentaria es limitada. Bancalari y col., 2016⁽²⁷⁾ aplicaron esta técnica para estimar las BAL iniciadoras en la fermentación de la leche y Batrinou y col., 2005⁽²⁸⁾ para estimar las bacterias totales en el chocolate.

3.3.2.5 PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR)

La qPCR es una técnica que se fundamenta en la PCR convencional, con adición de un fluoróforo que se une de forma inespecífica o específica al ADN de cada ciclo de reacción. En la qPCR, la medición de la fluorescencia es después de cada ciclo; por lo tanto, inicialmente la fluorescencia es muy baja y a medida que se incrementan los ciclos, la intensidad de la fluorescencia aumenta. El ciclo umbral (CT) es el ciclo en el que la intensidad de la fluorescencia se diferencia del ruido o fondo y cruza el límite umbral (threshold)^(30, 31).



Fuente. Valasek y col.⁽³⁰⁾

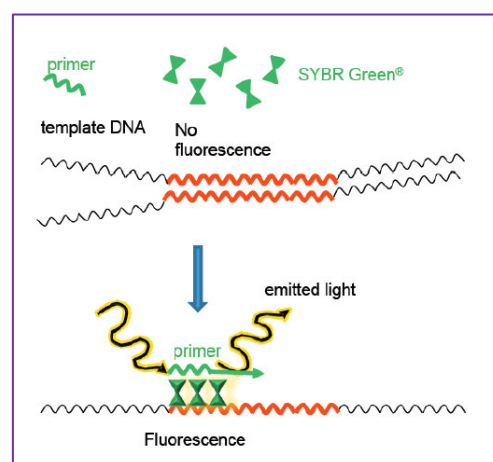
Figura 6. Curvas de amplificación en qPCR

Las ventajas de la técnica son: trabajan en un sistema cerrado evitando la contaminación, análisis rápido y fácil, rango de cuantificación amplio, mayor fiabilidad y alta sensibilidad a diferencia de los métodos convencionales⁽³²⁾.

Tipos de qPCR según el tipo de fluoróforo utilizado

Agentes intercalantes

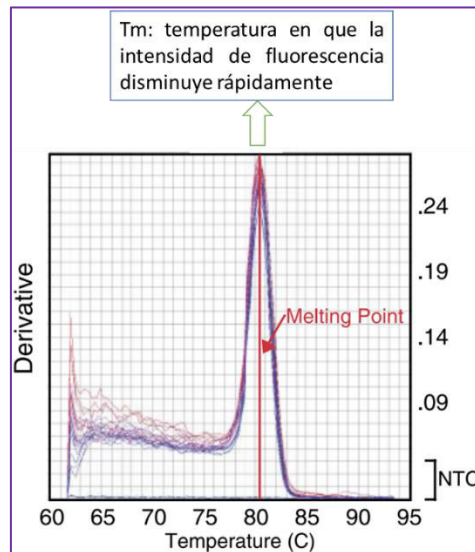
Es un método no específico que se fundamenta en el uso de fluoróforos que tienen afinidad al ADN de doble cadena, el más usado es el SYBR Green I que se intercala al ADN 100 veces más que el bromuro de etidio. El colorante unido al surco menor del ADN emite 1000 veces mayor fluorescencia que el colorante libre⁽³³⁾. El control de fluorescencia se realiza ya sea al final de la polimerización o hibridación de cada ciclo según como se optimice la reacción. Según transcurren los ciclos de reacción, el número de copias de ADN se incrementa, así como la fluorescencia. La principal ventaja de este colorante es su bajo costo, sin embargo la formación de dímeros y la unión a productos inespecíficos lo convierte en un método laborioso durante la optimización. Por ello, el diseño y selección de los primers es elemental para evitar la formación de dímeros.



Fuente. Rodríguez-Lázaro y col.⁽³⁴⁾

Figura 7. Mecanismos de detección con SYBR Green I

Al final de la qPCR se evalúa la temperatura de disociación o T_m (temperatura de melting) el cual indica que el 50% del producto está en su forma simple, si hay más de dos T_m indicaría la formación de dímeros o productos inespecíficos (figura 8). El valor T_m depende de la longitud del amplificado y la composición de nucleótidos.



Fuente. Valasek y col.⁽³⁰⁾

Figura 8. Curva de temperatura de disociación del ADN

Sondas de hibridación específica

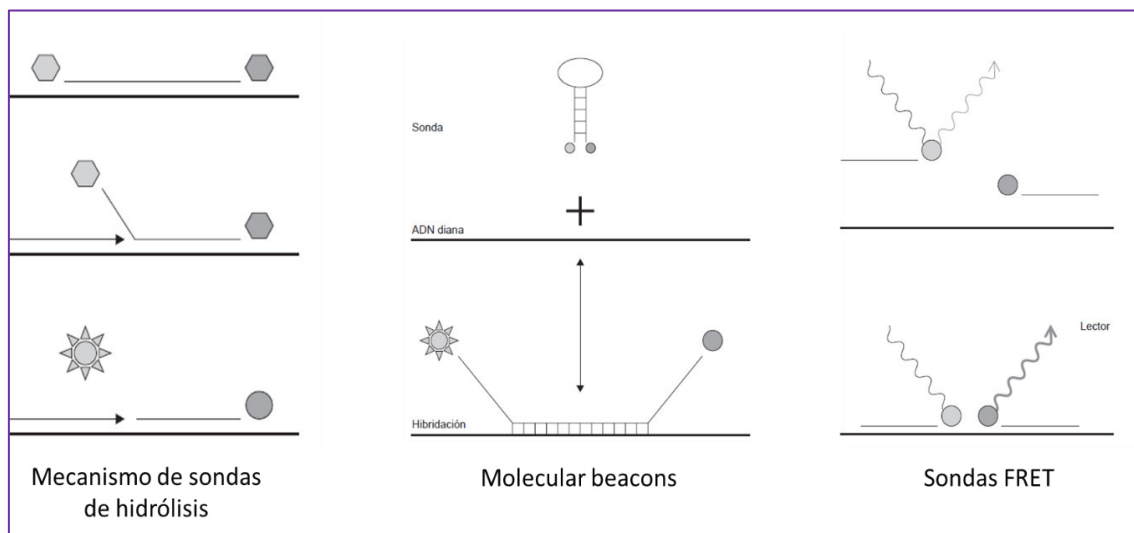
Estas sondas están compuestas por dos tipos de fluorocromos: donador y receptor, estos se fundamentan en la transferencia de energía mediante resonancia (FRET). Los tres tipos de sondas son: sondas TaqMan o de hidrólisis, sondas molecular beacons y sondas FRET.

Sondas TaqMan. Son oligonucleótidos que en su extremo 5' está marcado con un donador que emite fluorescencia y en su extremo 3' con un receptor que absorbe la fluorescencia. La taq polimerasa por presentar actividad 5' exonucleasa hidroliza el extremo 5' de la sonda en su acción de síntesis, liberando al fluorocromo donador alejándose del aceptor al punto que este no alcanza a absorber la fluorescencia. El lector del termociclador absorbe la

fluorescencia del donador siendo directamente proporcional a la concentración de copias de ADN.

Molecular beacons. La sonda presenta un donador y un receptor, la sonda presenta una configuración de asa afín de que el donador se encuentre espacialmente cercana al receptor, sin embargo cuando la sonda se hibrida con el ADN, el donador se aleja del receptor por lo que la fluorescencia emitida por el donador es captada por el lector del termociclador.

Sondas FRET. En este sistema existen dos sondas uno de ellos marcados con el donador en el extremo 3' y el otro con el receptor en el extremo 5'. Estos se hibridan en forma adyacente permitiendo la absorción de la fluorescencia del donador por el receptor. Este a su vez libera su propia fluorescencia que es detectada por el lector.



Fuente. Costa, J.⁽³⁵⁾

Figura 9. Sondas de hibridación específica

Etidio monoazida-PCR y de propidio monoazida-PCR (EMA-PCR, PMA-PCR)

Son técnicas que se limitan a la detección y cuantificación de células con membranas íntegras (viables). El etidio monoazida (EMA) y propidio monoazida son tintes intercalantes del ADN que atraviesan fácilmente la membrana comprometida de las células muertas. EMA y PMA penetran en las células muertas y se unen al ADN. La exposición a la luz durante 1 min conduce a la unión covalente y la inactivación de EMA libre. Los ADN unidos a EMA y PMA no se podrán amplificar en la qPCR. Sin embargo, los ADN libre provenientes de células viables quedarán para la amplificación en la qPCR^(9, 36).

Vendrame y col., 2013, y García-Cayuela y col., 2009 usaron esta técnica para cuantificar BAL viables en mosto y vino, y leche fermentada, respectivamente^(37,38)

qPCR con transcriptasa inversa (RT-qPCR)

Se fundamenta en la PCR convencional. Pero primero el ácido ribonucleico (RNA) es transcrito en su ADN complementario utilizando la transcriptasa inversa. La atención se ha dirigido al uso de ARNm como marcador de viabilidad. Este marcador es una molécula muy inestable con una vida media muy corta (segundo) en las bacterias. Por lo tanto, la detección y cuantificación del ADN complementario indica viabilidad de los microorganismos⁽⁹⁾.

El ARN ribosómico (ARNr) también se está usando como indicador de viabilidad celular^(39,40). Desroche y col., 2005 y Falentin y col., 2012 usaron esta técnica para ver la respuesta al estrés de *Oenococcus oeni* y cuantificar BAL iniciadoras en la fermentación de queso Emmental, respectivamente^(41, 42).

4 METODOLOGÍA

4.1 Optimización de la cuantificación de BAL por qPCR

4.1.1 Cepas de BAL

Las cepas usadas para ese estudio se mencionan en la tabla 7. Las cuales fueron reactivadas en medio MRS (Merck, Darmstadt, Alemania) a 30 °C. Las cepas *L. plantarum* D12-18, *L. plantarum* D27-27 y *L. plantarum* D27-28 son las que se inocularon para la fermentación controlada del ají “charapita”.

Tabla 7. Cepas de BAL usadas en este estudio

Código	Bacterias ácido lácticas	Número de acceso	Fuente
B1	<i>Weissella confusa</i>	KY977385	<i>Anacardium occidentale</i> (Casho)
B2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KY977388	<i>Passiflora nítida</i> (Granadilla)
B3	<i>Weissella cibaria</i>	KY977390	<i>Psidium guayaba</i> (Guayaba)
B4	<i>Lactococcus brevis</i>	KY977400	<i>Oenocarpus batava</i> (Ungurahui)
B5	<i>Lactobacillus. plantarum</i>	KY977397	<i>Citrus paradisi</i> (Toronja)
B6	<i>Weissella cibaria</i>	KY977391	<i>Psidium guayaba</i> (Guayaba)
B7	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	D0-1*	<i>Capsicum frutescens</i> (Ají “charapita”)
B8	<i>Lactobacillus plantarum</i>	D12-18*	<i>Capsicum frutescens</i> (Ají “charapita”)
B9	<i>Lactobacillus plantarum</i>	D27-27*	<i>Capsicum frutescens</i> (Ají “charapita”)
B10	<i>Lactobacillus plantarum</i>	D27-28*	<i>Capsicum frutescens</i> (Ají “charapita”)
B11	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917	-	Col en vinagre
B12	<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 11454	-	Leche

* Cepas nativas de colección de BAL del laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM

4.1.2 Especificidad de los primers

El ADN genómico de las cepas de BAL se obtuvieron por microextracción según protocolo de la figura 10.

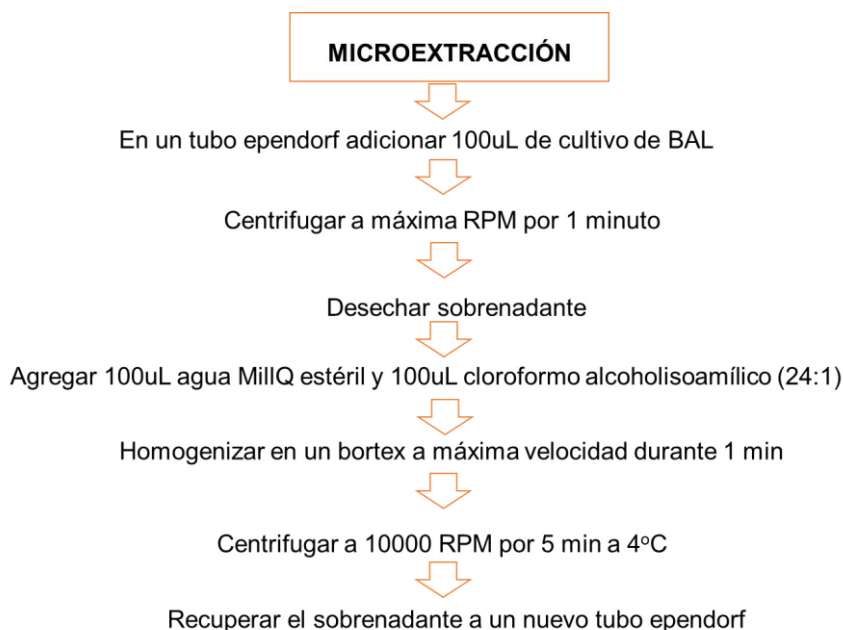


Figura 10. Protocolo de la microextracción de ADN genómico de BAL

La especificidad de los primers WLAB1-WLAB2 se comprobó utilizando un termociclador (Perkim Elmer 2400, Norwalk, Estados Unidos), según el protocolo descrito por López y col.⁽⁴³⁾, con algunas modificaciones. El volumen final de la reacción fue 20 μ L que contenía Buffer 10X; $MgCl_2$ 2,5 mM; dNTPs 0,2 Mm; 0,2 μ M de cada primers; taq-polimerasa 2,5 U y 5 μ L ADN.

Las condiciones de la PCR fueron: una desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min; seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 1 min, hibridación a 60 °C durante 30 seg y extensión a 72 °C durante 1 min; y una extensión final a 72 °C durante 5 min.

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa (Sigma Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) al 2% (p/v) en buffer TBE 1X. El

marcador de ADN de 100 pb (Thermo Scientific, Massachusetts, Estados Unidos) fue utilizado para estimar el tamaño de peso molecular de los productos amplificados. Finalmente, el gel fue teñido con bromuro de etidio y visualizados con luz UV.

4.1.3 Preparación del medio que simula las condiciones de fermentación controlada

A un frasco de vidrio estéril conteniendo los ajíes al 35 % (p/v), se agregó el líquido de fermentación (NaCl 5%(p/v) (Calbiochem, Darmstadt, Alemania) y glucosa 2,5% (p/v) (Amresco, Ohio, Estados Unidos)). Se incubó a temperatura ambiente por tres días. Después, los ajíes fueron separados por filtración y el líquido se centrifugó a 10000 RPM durante 5 min. Finalmente, el líquido se esterilizó por filtración.

4.1.4 Curva de crecimiento

La curva de crecimiento se realizó con la cepa de *Lactobacillus (L.) plantarum* ATCC 14917. Esta prueba se inició con una población 10^6 cel.mL⁻¹ en medio MRS y medio de fermentación formulado a 30 °C por 28 horas en condiciones aeróbicas en un volumen final de 50 mL, el muestreo fue realizado cada dos horas. En cada muestreo, se realizó el conteo de células por microscopio (Beltec Scientific, Lima, Perú) usando la cámara de Neubauer y colonias viables usando la técnica de recuento en placas (anexo 4) según la norma ISO 15214, con algunas modificaciones (anexo 4). El medio MRS (Merck, Darmstadt, Alemania) se incubó a 30 °C por 2 días y en anaerobiosis, empleando Anaerocult A (Merck, Darmstadt, Alemania) y bolsas de anaerobiosis.

4.1.5 Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN se realizó usando el método descrito por Ausubel y col.⁽⁴⁴⁾, con algunas modificaciones según protocolo adjunto (figura 11)

1. Centrifugar 10 mL de medio de cultivo a 10000 RPM x 5 min.
2. Añadir 1 mL de agua estéril.
3. Centrifugar a 10000 RPM por 5 min.
4. Descartar sobrenadante.
5. Añadir 570 µl de TE (tris 10 mM, EDTA 1 mM), 30 µL de SDS 10% y 12 µL de proteinasa K (10 mg/mL).
6. Incubar a 37 °C por 1 hora.
7. Añadir 100 µL de NaCl 5M.
8. Añadir 80 µL de CTAB/NaCl (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio: CTAB 10% en NaCl 0,7 M).
9. Incubar a 65 °C por 10 min.
10. Congelar a -20 °C por 10 min.
11. Añadir 700 µL de mezcla cloroformo/alcohol isoamílico (24:1 v/v).
12. Centrifugar a 10000 PRM por 10 min a 4 °C.
13. Recoger la fase superior y trasvasar a un nuevo tubo con 500 µL de isopropanol.
14. Centrifugar a 10000 RPM por 10 min a 4 °C.
15. Añadir 350 µL de etanol al 70% (v/v)
16. Centrifugar a 10000 RPM por 10 min a 4 °C.
17. Secar en estufa a 42 °C por 20 min.
18. Re-suspender en 50 µL de buffer TE.
19. Dejar a 4 °C por 24 horas y congelar a -20 °C.

Figura 11. Protocolo de extracción de ADN genómico

4.1.6 Elaboración de la curva estándar

La cepa usada para realizar la curva estándar fue *L. plantarum* ATCC 14917. La curva estándar se realizó tanto en medio MRS como en medio de fermentación formulado. La extracción de ADN se realizó a partir de una población $8 \log_{10}$

cel.mL⁻¹. Una vez extraído el ADN de la población 8 log₁₀ cel.mL⁻¹ se realizó diluciones seriadas hasta la dilución de ADN correspondiente a la concentración de log₁₀ cel.mL⁻¹. Así, se elaboró la curva estándar de BAL utilizando el protocolo descrito por Neeley y col.⁽⁴⁵⁾, con algunas modificaciones. El volumen final de reacción fue 20 µL conteniendo SYBR Green Master Mix 1X (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos), 0,2 µM de cada primers y 4 µL de ADN.

Los parámetros de qPCR fueron: Una primera desnaturalización a 95 °C por 10 min; seguido por 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 15 seg, hibridación a 60 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 1 min; finalmente con la curva de disociación o T_m. Cada dilución fue realizada por triplicado mediante la qPCR (Applied Biosystems StepOne Plus™, Foster City, California, Estados Unidos). La curva estándar fue graficada trazando los valores de CT (ciclo umbral) de las diluciones seriadas de ADN obtenidos por qPCR, frente al logaritmo de las poblaciones de BAL.

4.2 Preparación de la fermentación

La fermentación controlada fue realizada en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. A continuación se muestra el flujograma de preparación de la fermentación controlada del ají “charapita”.

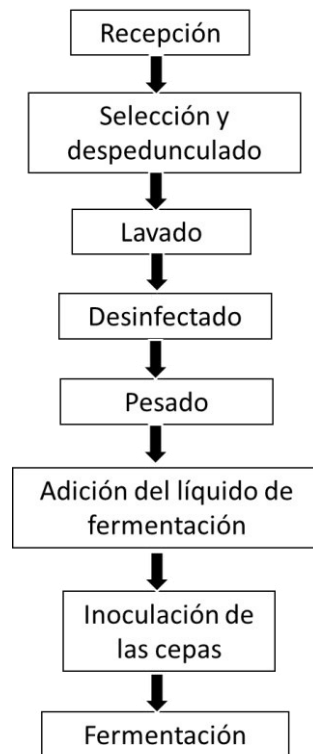


Figura 12. Flujograma de la elaboración de la fermentación controlada del ají "charapita"

Recepción: Las muestras de ajíes se utilizaron después de ingresar al laboratorio.

Selección y despedunculado: Los ajíes amarillos fueron seleccionados y despedunculados, se descartaron los de coloración verde, amarillo-marrón o marrón.

Lavado: Los ajíes se lavaron para eliminar tierra, hojas, pedúnculo y otras partículas extrañas.

Desinfectado: En un recipiente de vidrio estéril los ajíes fueron cubiertos completamente con la solución desinfectante de hipoclorito de sodio 100 ppm durante 15 min. Finalmente, los ajíes se lavaron con agua estéril para eliminar restos de hipoclorito de sodio

Pesado y adición del líquido de fermentación: El peso de los ajíes fue 35% (p/v) del volumen final de fermentación. Estos fueron agregados al contenedor de fermentación junto con el líquido de fermentación (NaCl 5% (p/v) y glucosa 2,5% (p/v)) hasta completar 1,8 L.

Inoculación de las cepas: Estas cepas *L. plantarum* D12-18, *L. plantarum* D27-27 y *L. plantarum* D27-28 fueron previamente aisladas de la fermentación espontánea del ají “charapita” y conservadas a -20 °C. Las tres cepas de BAL fueron reactivadas en medio MRS, previa a la inoculación. El volumen de inóculo fue calculado considerando una población de 10^6 cel.mL⁻¹ al inicio de la fermentación.

Fermentación: La fermentación fue realizada a temperatura ambiente. Los contenedores fueron sellados herméticamente para evitar la contaminación cruzada.

4.3 Muestreo de la fermentación controlada

Los muestreos fueron realizados al inicio, 3, 6, 12, 18, 27, 32 y 37 días. Finalmente, se procedió a realizar los análisis fisicoquímicos, microbiológicos y cuantificación de BAL por qPCR.

4.3.1 Análisis fisicoquímicos

Los análisis fisicoquímicos realizados durante la fermentación controlada fueron: acidez total titulable según AOAC (Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists), azúcares reductores descrito por Miller y col.⁽⁴⁶⁾ y pH⁽⁴⁷⁾.

4.3.2 Análisis microbiológicos

Los análisis microbiológicos fueron conteo total de células por microscopía usando la cámara de Neubauer (anexo 3) y el recuento de células viables por la

técnica de recuento en placas según la norma ISO 15214 (anexo 4). El medio MRS es suplementado con nistatina 100 mg/L (Merck, Darmstadt, Alemania) (anexo 1).

4.3.3 Cuantificación de BAL por qPCR

Primero se extrajo el ADN genómico de cada muestra, después se realizó la qPCR usando SYBR Green Master Mix. Tanto las diluciones de la curva estándar y las muestras problemas se tomaron para realizar al mismo tiempo la qPCR. Los CT obtenidos fueron comparados con los CT de la curva estándar para determinar la población de BAL de la muestra problema. La cuantificación fue realizada por triplicado.

4.4 Análisis estadístico

Los resultados de los contajes al microscopio, recuento en placa y cuantificación de BAL por qPCR se analizaron mediante el análisis de varianza de un solo factor y el test de Tukey con el software STATISTICA 10.0. El grado estadístico significativo se estableció con un valor $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Optimización de la técnica de cuantificación de BAL por qPCR

5.1.1 Especificidad de los primers frente a BAL nativas de la Región Loreto

La especificidad de los primers WLAB1-WLAB2 fue comprobada con las BAL aisladas de frutos nativos de la Región Loreto y de fermentaciones del ají “charapita”. En todos los casos se amplificó un fragmento de ADN de 400 pb aproximadamente (Figura 13). Sin embargo, no amplificó a *Candida albicans* ATCC 60193 (resultado no mostrado).

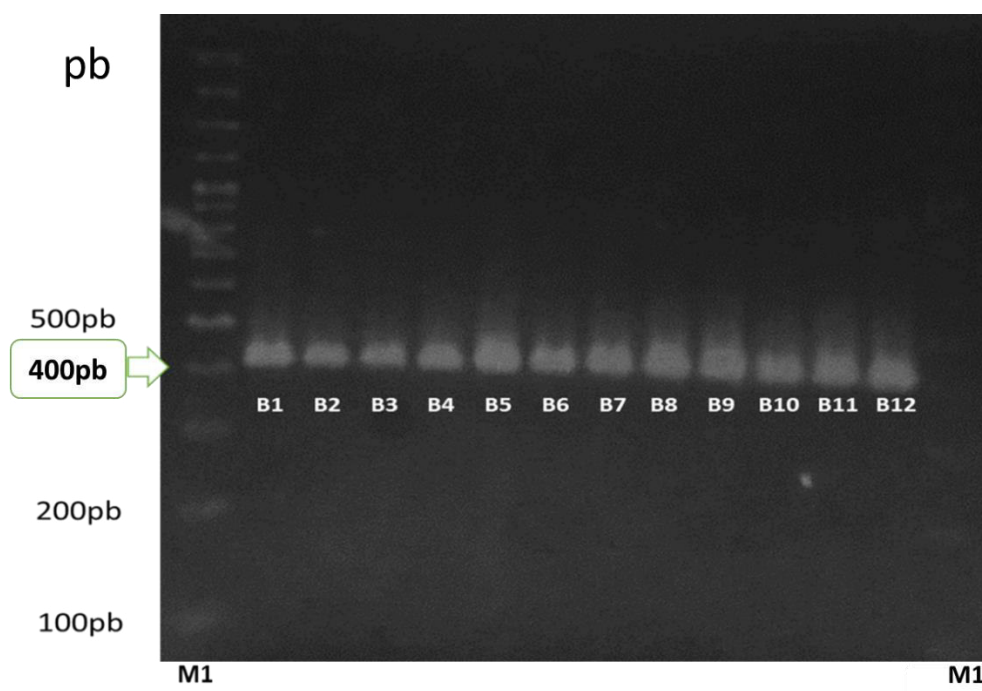


Figura 13. Amplificación de ADN utilizando primers universales WLAB1 y WLAB2. Carriles del B1 al B12 corresponden a cepas de BAL. M1, marcador ladder de 100 pb

5.1.2 Curva de crecimiento

Previo a la elaboración de la curva estándar de *L. plantarum* ATCC 14917 fue necesario conocer la población del cultivo en medios MRS y fermentación formulado. Para ello, se realizó la cinética de crecimiento celular por conteo por

microscopio (cel.mL^{-1}) y recuento por placas (UFC.mL^{-1}) cultivados en los medios MRS y fermentación formulado. Se inició con una población de $6 \log_{10} \text{ cel.mL}^{-1}$ para ambos medios. En medio MRS, *L. plantarum* ATCC 14917 alcanzó la máxima concentración celular de $9 \log_{10} \text{ cel. mL}^{-1}$ y además la fase estacionaria entre las 12 y 15 horas (figura 14). Tanto la población de células totales obtenidas por recuento por microscopio como viables fueron similares hasta las 12 horas aproximadamente. La población de $8 \log_{10} \text{ cel.mL}^{-1}$ y UFC.mL^{-1} alcanzó a las 8 horas aproximadamente. Por lo tanto, para la curva estándar se extrajo el ADN de *L. plantarum* ATCC 14917 a las 8 horas. En el medio de fermentación formulado, *L. plantarum* ATCC 14917 alcanzó una población máxima de $7,9 \log_{10} \text{ cel.mL}^{-1}$ y UFC.mL^{-1} a las 24 horas. A partir de las 24 horas se inició la fase estacionaria de células viables y totales por microscopio (resultados no mostrados). Por lo tanto, para la curva estándar se extrajo el ADN de *L. plantarum* ATCC 14917 a las 24 horas de cultivo.

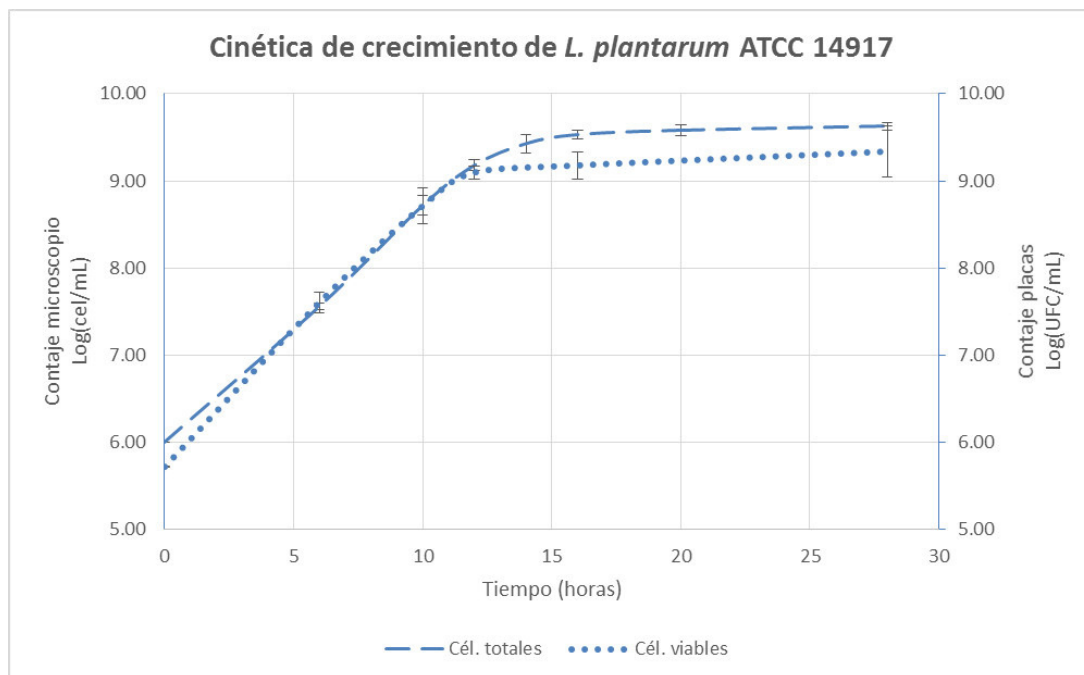


Figura 14. Cinética de crecimiento de *L. plantarum* ATCC 14917 en medio MRS

5.1.3 Elaboración de la curva estándar de *L. plantarum* ATCC 14917

Para determinar la sensibilidad y los límites de detección de la qPCR, del ADN genómico extraído se realizó diluciones seriadas de $8 \log_{10}$ a \log_{10} cel.mL⁻¹ con la finalidad de tener poblaciones de *L. plantarum* ATCC 14917 conocidas para la curva estándar.

Con los CT (ciclo umbral) que se obtuvo versus las diluciones seriadas se construyó la curva de calibración tanto para los medios MRS y fermentación formulado. Los límites de detección de la curva estándar a partir del medio MRS y medio de fermentación formulado fueron 1,7 y 2,9 \log_{10} (cel.mL⁻¹) respectivamente (figura 15). Así mismo, se obtuvo una linealidad de 6 y 5 órdenes de magnitud para MRS y el medio de fermentación formulado, respectivamente. A pesar de tener las mismas poblaciones de *L. plantarum* ATCC 14917, los CT en el medio MRS fueron detectados antes de medio de fermentación formulado. Finalmente, la T_m de los productos obtenidos en ambos medios fue de 83 °C (anexo 8).

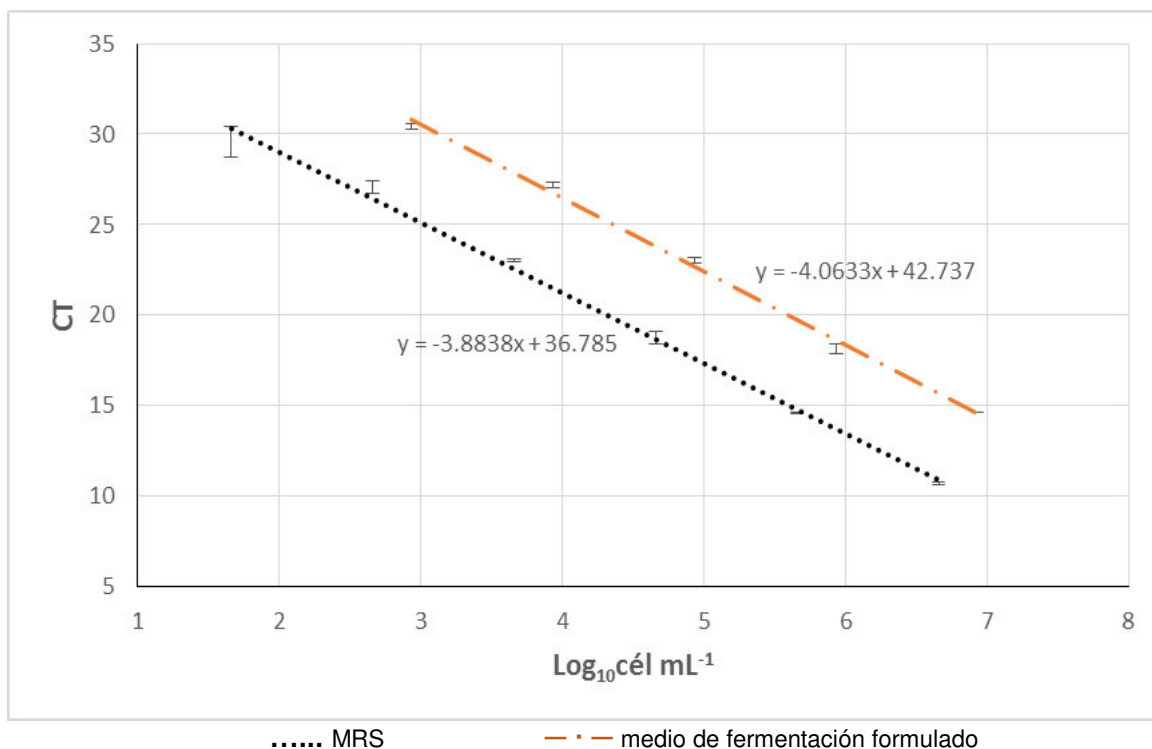


Figura 15. Curva estándar obtenida por qPCR a partir de diluciones seriadas de ADN genómico de *L. plantarum* ATCC 14917

En la tabla 8 se presenta el coeficiente de correlación, la pendiente y la eficiencia de la curva estándar para los medios MRS y fermentación formulado. Estos datos se obtuvieron automáticamente por el software del equipo. El coeficiente de correlación y la pendiente de ambas curvas estándar fueron similares. Sin embargo, la eficiencia de la curva estándar del medio MRS (80,92 %) fue mayor al del fermentación formulado (76,24 %).

Tabla 8. Coeficientes de correlación (r^2), pendientes (S) y eficiencias (E) de curvas estándar obtenidas a partir de los medios MRS y fermentación formulado

Medio de cultivo	r^2	S	E (%)
MRS	0,993	-3,884	80,92
Fermentación formulado	0,995	-4,063	76,243

E : La eficiencia fue obtenida con la fórmula $10^{-1/S} - 1$

5.2 Fermentación controlada del ají “charapita” a escala piloto

El seguimiento de la fermentación controlada se realizó por análisis fisicoquímicos y microbiológicos.

5.2.1 Análisis fisicoquímicos

En la figura 16 se observa los valores de los azúcares reductores, acidez total titulable y pH, donde la fermentación fue considerada terminada a los 37 días, cuando la concentración de los azúcares reductores fue ≤ 1 g/L. La concentración inicial de azúcares reductores fue de $21,65 \pm 0,52$ g/L. La acidez total titulable al final de la fermentación fue $1,12 \pm 0,04$ %. Así mismo, el pH inició en $4,74 \pm 0,32$ y finalizó en $2,88 \pm 0,02$ (anexo 9).

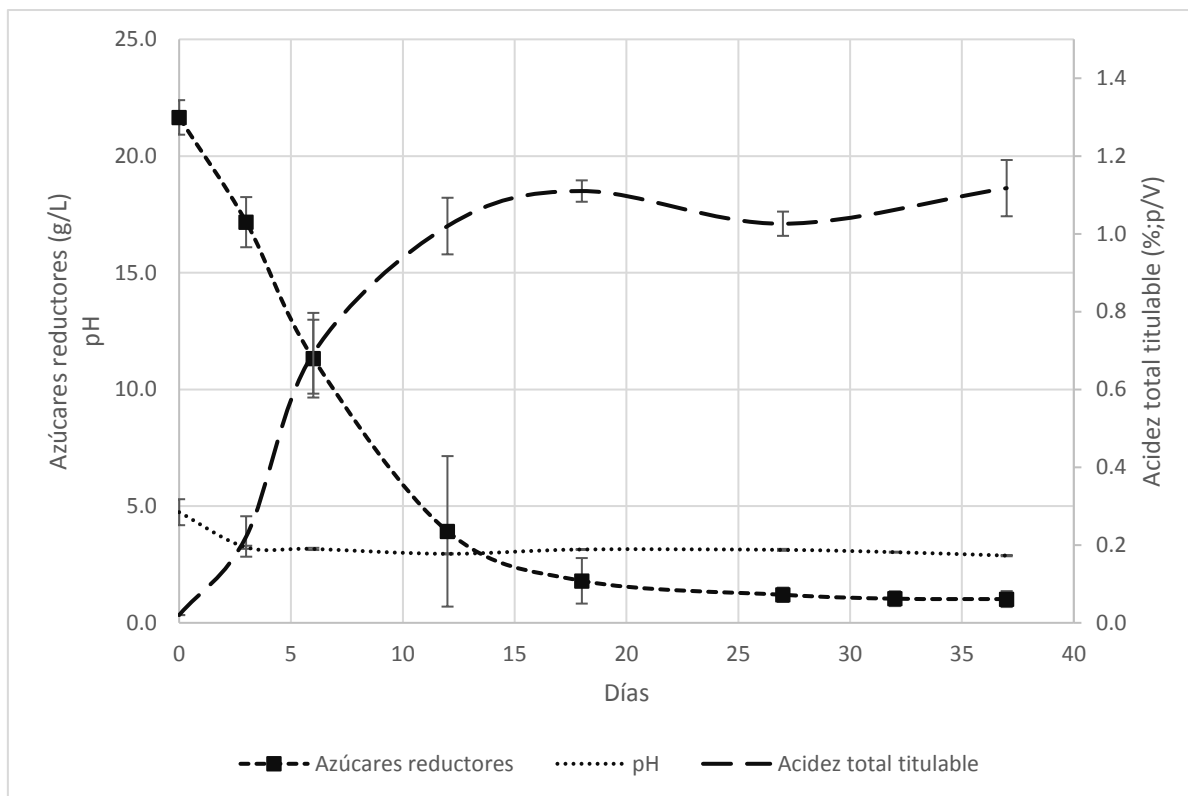


Figura 16. Análisis fisicoquímicos de azúcares reductores, pH y Acidez total titulable durante la fermentación controlada del ají “charapita”

5.2.2 Análisis microbiológicos y cuantificación de BAL por qPCR

Los análisis microbiológicos incluyeron recuento de células de BAL por microscopio y células viables por placas, así como la cuantificación de BAL por qPCR. En este sentido, la tabla 9 muestra las poblaciones de BAL obtenidas por los tres métodos de cuantificación. Usando el recuento por microscopio se observó una población bacteriana máxima de $8,9 \log_{10} \text{ cel.mL}^{-1}$ el día 3 y la cual se mantuvo relativamente constante hasta el final de la fermentación. La población máxima de células viables cuantificadas por placas fue $8 \log_{10} \text{ UFC.mL}^{-1}$ el día 6 y al final de la fermentación fue disminuyendo su población hasta $6,4 \log_{10} \text{ UFC.mL}^{-1}$. Finalmente, la cuantificación de BAL por qPCR detectó la máxima población el día 3 donde se obtuvo $9,3 \log_{10} \text{ cel.mL}^{-1}$ y al final de la

fermentación disminuyó a $8,5 \log_{10} \text{ cel.mL}^{-1}$. Comparando los resultados obtenidos por los tres métodos de cuantificación, se observó que los valores del recuento por microscopio y qPCR de los días 0, 3, 6, 18, 27 y 37 no presentan diferencias significativas. Las cuantificaciones de viables en medio MRS fueron diferentes a los obtenidos por microscopio y qPCR en todos los muestreos realizados durante la fermentación.

Tabla 9. FAL controlada del ají “charapita” y cuantificación de la población por microscopio, viables en medio MRS y qPCR

TÉCNICA	DÍAS						
	0	3	6	12	18	27	37
Microscopio ($\text{Log}_{10} \text{ cel.mL}^{-1}$)	6,9	8,9	9,0	8,8	8,7	8,8	8,7
Viables en medio MRS ($\text{Log}_{10} \text{ UFC.mL}^{-1}$)	6,2	7,3	8,0	7,8	6,6	6,8	6,4
qPCR de BAL ($\text{Log}_{10} \text{ cel.mL}^{-1}$)	$6,9 \pm 0,01$	$9,3 \pm 0,00$	$9,0 \pm 0,01$	$9,4 \pm 0,01$	$8,9 \pm 0,01$	$8,6 \pm 0,02$	$8,5 \pm 0,05$

6 DISCUSIÓN

El aumento de la población humana exige mayor demanda de alimentos, sobre todo, los de origen natural o procesados sin preservantes químicos. En consecuencia, los estándares de calidad de los alimentos están enfocados en la seguridad, la integridad y el valor nutritivo⁽⁴⁸⁾. Para lo cual, se requieren técnicas de detección y cuantificación sensibles, rápidas y fiables. Por ello, el objetivo de esta investigación fue usar la técnica qPCR usando “SYBR Green” para la detección y cuantificación de las BAL utilizados en la fermentación controlada del ají “charapita”.

En la fermentación controlada se inocula microorganismos identificados y caracterizados con la finalidad de disminuir el deterioro, mejorar las características organolépticas, reducir el tiempo de fermentación, mejorar las características nutricionales y brindar beneficios para la salud^(12, 49-51). Para conseguir estos beneficios de la fermentación, es importante tener un control de los microorganismos en tiempo y espacio durante el bioproceso. En este aspecto, el uso de los métodos tradicionales tales como recuento por microscopio y en placas no permiten un seguimiento óptimo del proceso, en cambio la qPCR es una técnica, sensible, específica y rápida en la detección y cuantificación de los microorganismos, la cual permite controlar el bioproceso⁽³³⁾.

En el estudio sobre la optimización de las condiciones de fermentación espontánea del ají “charapita”⁽⁴⁷⁾ se determinó las concentraciones de NaCl y glucosa con la finalidad de incrementar la acidez, la población de BAL y disminuir la acidez y los microorganismos que deterioran el alimento fermentado. Así, las concentraciones óptimas para iniciar la fermentación del ají “charapita” fueron

NaCl 5% y glucosa 2,5% (p/v); en estas condiciones, la fermentación controlada finalizó a los 37 días, tiempo menor en 10 días al de la fermentación espontánea de ají “charapita”⁽⁵²⁾. Sin embargo, al final de la fermentación, los valores de pH, acidez total titulable y azúcares reductores fueron similares. Este trabajo coincide con otros reportados donde la inoculación de microorganismos procedentes de la fermentación espontánea disminuye el tiempo de fermentación^(54, 55).

La especificidad de estos primers fue verificada con cepas nativas de BAL aisladas de la fermentación espontánea del ají “charapita” así como cepas tipo de *L. plantarum* ATCC 14917 y *L. lactis* ATCC 11454. En todas las cepas de BAL se observó la amplificación de un producto de 400 pb, indicando que estos primers pueden ser utilizados en la detección y la cuantificación de cepas de BAL nativas. La especificidad de los primers también fue probada contra levaduras, dado que Vegas y col.⁽⁵²⁾ describen que las BAL y levaduras son responsables de la fermentación espontánea del ají “charapita”, pero no se detectó amplificación cruzada. López y col.⁽⁴³⁾ determinó la especificidad de los primers WLAB1 y WLAB2 frente a varias cepas de BAL y levaduras, confirmando que son específicos para cepas de BAL.

El medio de fermentación formulado se obtuvo de la fermentación espontánea del ají “charapita” durante tres días, finalmente fue esterilizada por filtración, el cual sirvió como medio de cultivo para la elaboración de la cinética de crecimiento y la curva estándar de qPCR. Vegas y col.⁽⁵²⁾ determinaron mayor concentración de azúcares residuales en el tercer día de fermentación en el medio de fermentación formulado.

Las cinéticas del crecimiento de *L. plantarum* ATCC 14917 en medios MRS y fermentación formulado fueron realizadas por conteo al microscopio y recuento

de viables en medio MRS. Así, las poblaciones de BAL obtenidas por microscopio como en placas fueron similares hasta las 12 horas de cultivo en MRS y 24 horas en medio de fermentación formulado, donde ambas tuvieron una población de $9 \log_{10} \text{ cel.mL}^{-1}$ y $7,9 \log_{10} \text{ cel.mL}^{-1}$, respectivamente. Para la elaboración de la curva estándar de qPCR de *L. plantarum* ATCC 14917, la concentración de este debe estar en el orden $8 \log_{10} \text{ cel.mL}^{-1}$. En este sentido, el tiempo de cultivo necesario de *L. plantarum* ATCC 14917 fueron 8 y 24 horas en medio MRS y medio de fermentación formulado, respectivamente.

Según Neeley y col.,⁽⁴⁵⁾ los CT cercanos a 40 se deben generalmente a productos inespecíficos o dímeros por lo que los CT superiores a 35 no se consideraron. En la curva estándar de las diluciones de 8 a $1 \log_{10} \text{ cel.mL}^{-1}$ de *L. plantarum* ATCC 14917 cultivados en medio MRS y fermentación formulado. El límite de detección en medio MRS ($1,7 \log_{10} \text{ cel.mL}^{-1}$) fue menor que el del medio de fermentación formulado ($2,9 \log_{10} \text{ cel.mL}^{-1}$). Además, las diluciones del medio MRS fueron detectados antes que el del medio de fermentación formulado.

Los parámetros de la curva estándar como el coeficiente de correlación de Pearson (r^2) tanto en medio MRS como fermentación formulado fue cercano a 1, mostrando un ajuste lineal cercano a 1 entre las diluciones realizadas, en la preparación del mix de PCR y corrida de las muestras por qPCR. Las pendientes también fueron similares entre ambos medios, el valor negativo de la pendiente indica que a mayor población de BAL menor es el valor del ciclo umbral. Además, la eficiencia en el medio MRS (80,92 %) fue más alta que la obtenida en medio de fermentación formulado (76,24 %). Los errores estándar de las réplicas demuestran que el ensayo qPCR es reproducible y robusto cuando las BAL se cultivan en los medios MRS y fermentación formulado. Estas diferencias de

detección y eficiencia pueden ser debido a presencia de algunos componentes del ají “charapita”⁽⁵⁶⁾ que fueron liberados al medio de fermentación formulado que interfieren en la amplificación, extracción y/o purificación del ADN. Andorra y col.,⁽²⁹⁾ Neeley y col.,⁽⁴⁵⁾ y Hierro y col.,⁽⁴⁰⁾ presentaron el mismo problema de detección de BAL en vino con la técnica qPCR “SYBR Green”. Por ello, recomiendan realizar la curva estándar a partir de los componentes de la fermentación debido a que la matriz compleja pueda presentar inhibidores de la PCR, así como los polifenoles, taninos y polisacáridos pueden interferir durante la extracción, purificación y amplificación del AD⁽⁵⁷⁻⁶¹⁾. En este sentido, se utilizó la curva estándar de *L. plantarum* ATCC 14917 en medio de fermentación formulado, por presentar las mismas condiciones de la fermentación controlada.

Finalmente, la cuantificación de BAL por el método de qPCR utilizando “SYBR Green” durante la fermentación controlada del ají “charapita” fue comparada con el conteo al microscopio y el recuento de viables en medio MRS. En general, la población de BAL obtenidas por el conteo al microscopio fue similar a los obtenidos por qPCR; mientras que por el recuento de viables fue menor. La menor recuperación de BAL en placas puede ser debido al estado de células viables no cultivables⁽⁶²⁾ y células dañadas sub-letalmente^(12, 63-65). Millet y col.⁽⁶⁶⁾ reportaron la presencia de BAL en estado viable pero no cultivable durante la maduración de los vinos. Cabe precisar que en la enumeración de BAL en placas con agar MRS se suplementó con nistatina, de esta manera se incrementó el estrés para las cepas de BAL dañadas sub-letalmente. Las poblaciones obtenidas por recuento por microscopio y qPCR fueron similares, ambas técnicas no diferencian las células vivas y muertas. Sin embargo, las principales ventajas de qPCR son la especificidad, sensibilidad y rapidez.⁽⁶¹⁾ Además, previo

a la qPCR puede usarse compuestos que facilitan la extracción de ADN genómico solo de células viables, así como ocurre en las técnicas EMA-PCR y PMA-PCR. Hierro y col.⁽⁴⁰⁾ cuantificaron las células viables de levaduras durante la fermentación de vino con la técnica RT-qPCR utilizando ARN ribosómico y la comparó con la concentración celular obtenida por qPCR a partir del ADN genómico. Las poblaciones obtenidas por ambas técnicas resultaron ser similares en el mosto, mitad de la fermentación y al final de la fermentación. También, comparó las poblaciones obtenidas por ambas técnicas en muestras de vino añejas. Los resultados de RT-qPCR fueron menores a los de qPCR. Ésta diferencia podría ser a que el ARN es dependiente del estado fisiológico de la célula; lo cual podría influir en la cuantificación.

7 CONCLUSIONES

1. La fermentación controlada del ají “charapita” finalizó en 37 días con $1,02 \pm 0,24$ g/L de azúcares reductores, $2,88 \pm 0.02$ de pH y $1,12 \pm 0,04$ % de acidez total.
2. La qPCR se optimizó el cual tuvo como parámetros de sensibilidad de 1,7 y $2,9 \log_{10} \text{ cel.mL}^{-1}$ para el medio MRS y fermentación formulado, respectivamente; fue específico para BAL y fue reproducible.
3. Las poblaciones de BAL de la fermentación controlada del ají “charapita” obtenidas por la técnica qPCR fueron similares a las del recuento por microscopio, pero mayores a las del recuento en placas.

8 RECOMENDACIONES

Debido a la complejidad de la matriz de la fermentación se recomienda usar kits de extracción de ADN para aumentar la reproducibilidad de la extracción de ADN genómico y la calidad del ADN.

La estimación por qPCR de la fermentación controlada del ají “charapita”, no diferencian las células viables y no viables. Por eso se recomienda corroborar otras técnicas que permitan cuantificar solo células viables como RT-qPCR.

9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APEGA, UNALM, INIA U. Ajíes peruanos: Sazón para el mundo. El Comercio, editor. Lima; 2009.
2. Rengifo J, Saavedra J. Procesamiento y evaluación de la calidad de encurtido picante tipo pickle de *Averrhoa carambola* L. (carambola), *Averrhoa bilimbi* L. (limón chino), y *Capsicum frutescens* (ají charapita). [tesis para optar al Título de Ingeniero en Industrias Alimentarias]. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; 2015.
3. López G. Chilli: La especia del Nuevo Mundo. Vol. 69. México; 2003. p. 66–75.
4. Jäger M, Jiménez A, Amaya K. Las cadenas de valor de los ajíes nativos de Peru. 2013.
5. Libreros D, Zonneveld M, Petz M, et al. Catálogo de ajíes (*Capsicum spp.*) peruanos promisorios conservados en el bando de semillas del INIA-Perú. 2013. p. 1–50.
6. García J, Martín M, Bardales J, et al. Chacras Amazónicas: Guía para el manejo ecológico de cultivos, plagas y enfermedades. primera. Iquitos; 2010.
7. Ray B. Fundamental food microbiology. Third. CRC PRESS, editor. Boca Raton: Taylos and Francis e-Library; 2005. 114-118
8. Martin A, Maurice M. Food Microbiology. Third. Publishing R, editor. Guildford; 2008. 377-80
9. Davis C. Enumeration of probiotic strains: Review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria. J Microbiol Methods. 2014; 103: 9–17.
10. Tamang JP, Watanabe K, Holzapfel WH. Review: Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages. Front Microbiol. 2016; 7(377): 1–28.

11. Chilton SN, Burton JP, Reid G. Inclusion of Fermented Foods in Food Guides around the World. *Nutrients*. 2015; 7: 390–404.
12. Giraffa G. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiol Rev*. 2004; 28: 251–60.
13. Hill D, Sugrue I, Arendt E, et al. Recent advances in microbial fermentation for dairy and health. *F1000Research*. 2017; 6: 1–9.
14. Fernández M, Hudson JA, Korpela R, et al. Impact on Human Health of Microorganisms Present in Fermented Dairy Products: An Overview. *Biomed Res Int*. 2014; 2015: 1–13.
15. Lee M-E, Jang J-Y, Lee J-H, et al. Starter Cultures for Kimchi Fermentation. *J Microbiol Biotechnol*. 2015; 25(5): 559–68.
16. Mayeaux J, Sandine W, Elleker P. A selective medium for detecting *Leuconostoc* organisms in mixed-strain starter culture. *J Dairy Sci*. 1962; 45(5): 655.
17. Kepner RL, Pratt JR. Use of Fluorochromes for Direct Enumeration of Total Bacteria in Environmental Samples: Past and Present. *Microbiol Rev*. 1994; 58(4): 603–15.
18. Vegas C. Aplicación de métodos moleculares para el estudio de las bacterias acéticas implicadas en la elaboración de vinagre de vino tradicional. [Tesis doctoral]. Universitat Rovira i Virgili; 2010.
19. Amorocho C. Caracterización y potencial probiótico de bacterias lácticas aisladas de leche de oveja Guirra. [Tesis doctoral]. Universitat Politècnica de València; 2011.
20. Martínez R. Empleo de la técnica hibridación in situ fluorescente para visualizar microorganismos. *Salud UIS*. 2011; 43(3): 307–16.
21. Blasco L, Ferrer S, Pardo I. Development of specific Fluorescent oligonucleotide probes for in situ identification of wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett*. 2003; 225: 115–23.
22. Matte-tailliez O, Quéneé P, Cibik R, et al. Detection and identification of

- lactic acid bacteria in milk and industrial starter culture with fluorescently labeled rRNA-targeted peptide nucleic acid probes. *HAL*. 2001; 81: 237–248.
23. Barrera M, Drago E, Pérez J, et al. Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*. 2004; 17(1): 42–55.
 24. Bunthof CJ, Bloemen K, Breeuwer P, et al. Flow Cytometric Assessment of Viability of Lactic Acid Bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 2001; 67(5): 2326–35.
 25. Bensch G, Rüger M, Wassermann M, et al. Flow cytometric viability assessment of lactic acid bacteria starter cultures produced by fluidized bed drying. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014; 98(11): 4897–909.
 26. He S, Hong X, Huang T, et al. Rapid quantification of live/dead lactic acid bacteria in probiotic products using high-sensitivity flow cytometry. *Methods Appl Fluoresc*. 2017; 5(2): 24002.
 27. Bancalari E, Bernini V, Bottari B, et al. Application of Impedance Microbiology for Evaluating Potential Acidifying Performances of Starter Lactic Acid Bacteria to Employ in Milk Transformation. *Front Microbiol*. 2016; 7(1628): 1–11.
 28. Batrinou A, Katsogiannos E, Koustompardis E, et al. Estimation of microbial population of bitter chocolate mix by impedance measurement. *Nutrition*. 2005; 29(6): 260–4.
 29. Andorra I. Adaptation and development of culture-independent techniques for the identification and enumeration of microorganisms in wine fermentations. [Doctoral thesis]. Universitat Rovira i Virgili; 2010.
 30. Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ*. 2005; 29: 151–9.
 31. Kralik P, Ricchi M. A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics : Definitions , Parameters , and Everything. *Front Microbiol*. 2017; 8(108): 1–9.

32. Mackay I. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin Microbiol Infect. 2004; 10: 190–212.
33. Salihah NT, Hossain MM, Lubis H, et al. Trends and advances in food analysis by real-time polymerase chain reaction. J Food Sci Technol. Journal of Food Science and Technology; 2016; 53(5): 2196–209.
34. Rodríguez-lázaro D, Hernández M. Real-time PCR in Food Science : Introduction. Curr Issues Mol Biol. 2013; 15(2): 25–38.
35. Costa J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2004; 22(5): 299–305.
36. Rudi K, Moen B, Dromtorp SM, et al. Use of Ethidium Monoazide and PCR in Combination for Quantification of Viable and Dead Cells in Complex Samples. Appl Environ Microbiol. 2005; 71(2): 1018–24.
37. Vendrame M, Iacumin L, Manzano M, et al. Use of propidium monoazide for the enumeration of viable *Oenococcus oeni* in must and wine by quantitative PCR. Food Microbiol. 2013; 35(1): 49–57.
38. García-Cayuela T, Tabasco R, Peláez C, et al. Simultaneous detection and enumeration of viable lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented milk by using propidium monoazide and real-time PCR. Int Dairy J. 2009; 19(7): 405–9.
39. McKillip JL, Jaykus L, Drake M. rRNA Stability in Heat-Killed and UV-Irradiated Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157 : H7. Appl Environ Microbiol. 1998; 64(11): 4264–8.
40. Hierro N, Esteve-zarzoso B, González Á, et al. Real-Time Quantitative PCR (QPCR) and Reverse Transcription-QPCR for Detection and Enumeration of Total Yeasts in Wine. Applied and environmental microbiology. 2006; 72 (11): 7148–55
41. Desroche N, Beltramo C, Guzzo J. Determination of an internal control to apply reverse transcription quantitative PCR to study stress response in the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. J Microbiol Methods. 2005; 60(3): 325–33.

42. Falentin H, Henaff N, Le Bivic P, et al. Reverse transcription quantitative PCR revealed persistency of thermophilic lactic acid bacteria metabolic activity until the end of the ripening of Emmental cheese. *Food Microbiol.* 2012; 29(1): 132–40.
43. López I, Ruiz-larrea F, Cocolin L, et al. Design and Evaluation of PCR Primers for Analysis of Bacterial Populations in Wine by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and environmental microbiology.* 2003; 69(11): 6801–7.
44. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al. *Short Protocols in Molecular Biology: a compendium of methods from Current Protocols in Molecular Biology.* 5th ed. Wiley J, editor. New York; 2002.
45. Neeley ET, Phister TG, Mills DA. Differential Real-Time PCR Assay for Enumeration of Lactic Acid Bacteria in Wine. *Applied and environmental microbiology.* 2005; 71(12): 8954–7.
46. Miller G. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of reducing sugar. *Anal Chem.* 1959; 31(3): 426–8.
47. Sueros S. Optimización de la fermentación láctica espontánea del ají “Charapita” (*Capsicum frutescens*). [Tesis de pre-grado]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2017.
48. McKay J. Food industry and economic development in the Asia Pacific. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2007; 16(1): 80–4.
49. Bonatsou S, Tassou CC, Panagou EZ, et al. Table Olive Fermentation Using Starter Cultures with Multifunctional Potential. *MDPI.* 2017; 5(2): 1–16.
50. Patra JK, Das G, Paramithiotis S, et al. Kimchi and Other Widely Consumed Traditional Fermented Foods of Korea: A Review. *Front Microbiol.* 2016; 7: 1–15.
51. Tamang JP, Shin D, Jung S, et al. Functional Properties of Microorganisms in Fermented Foods. *Front Microbiol.* 2016; 7(578): 1–13.
52. Vegas C, Hurtado A, Amparo I, et al. Análisis de la dinámica de

- poblaciones microbianas durante las fermentaciones espontánea y controlada del Aji “Charapita” (*Capsicum frutescens*). Sci Agropecu. 2016; 7(3): 201–6.
53. Gonzáles D, Sueros S, Vegas C, et al. Caracterización molecular de los microorganismos responsables de la fermentación espontánea del ají “Charapita ” (*Capsicum frutescens*). Agron Colomb. 2016; 34(1): 1336–9.
 54. Jussier D, Morneau A, Orduña R. Effect of Simultaneous Inoculation with Yeast and Bacteria on Fermentation Kinetics and Key Wine Parameters of Cool-Climate Chardonnay. Appl Environ Microbiol. 2006; 72(1): 221–7.
 55. Corsetti A, Perpetuini G, Schirone M, et al. Application of starter cultures to table olive fermentation: an overview on the experimental studies. Front Microbiol. 2012; 3(248): 1–6.
 56. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, et al. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. J Appl Microbiol. 2012; 113: 1014–26.
 57. Martorell P, Querol A, Fernandez MT. Rapid Identification and Enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* Cells in Wine by Real-Time PCR. Appl Environ Microbiol. 2005; 71(11): 6823–30.
 58. Delaherche A, Claisse O, Lonvaud-Funel A. Detection and quantification of *Brettanomyces bruxellensis* and “ ropy ” *Pediococcus damnosus* strains in wine by real-time polymerase chain reaction. J Appl Microbiol. 2004; 97: 910–5.
 59. Phister TG, Mills DA. Real-Time PCR Assay for Detection and Enumeration of *Dekkera bruxellensis* in Wine. Appl Environ Microbiol. 2003; 69(12): 7430–4.
 60. Emmanuel-ikpeme C, Henry P, Okiri OA. Comparative evaluation of the nutritional , phytochemical and microbiological quality of three pepper varieties. J Food Nutr Sci. 2014; 2(3): 74–80.
 61. Andorra I, Landi S, Mas A, et al. Effect of oenological practices on microbial populations using culture- independent techniques. Food Microbiology. 2008; 25: 849–56.

62. Oliver JD. The Viable but Nonculturable State in Bacteria. *J Microbiol.* 2005; 43: 93–100.
63. Booth I. Stress and the single cell: intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. *Int J Food Microbiol.* 2002; 78: 19–30.
64. Fleet GH. Microorganisms in food ecosystems. *Int J Food Microbiol.* 1999; 50: 101–17.
65. Le TT, Ruysen T, Uyttendaele M, et al. Assessment with a compact flow cytometer of live, injured and dead probiotic lactobacilli and *Bifidobacteria* after subjecting to osmotic, freeze and heat stress. *Vietnam;* 2008; 178–84.
66. Millet V, Lonvaud funel A. The viable but non-culturable state of wine micro-organisms during storage. *Lett Appl Microbiol.* 2000; 30: 136–41.

10 ANEXOS

10.1 Anexo. Metodología

Anexo 1. Composición del medio MRS (Man, Rogosa y Sharpe)

Fórmula de MRS (en gramos por litro)

Mezcla de peptona	10.0
Extracto de carne	10.0
Extracto de levadura	5.0
Glucosa	20.0
Sorbitán monoleato	1 ml
Fosfato dipotásico	2.0
Acetato de sodio	5.0
Citrato de amonio	2.0
Sulfato de magnesio	0.2
Sulfato de manganeso	0.05
pH final: 6.5 ± 0.2	

Al medio MRS 52,2 g (Merck, Darmstadt, Alemania) se añadió agar 20 g (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) y agua destilada cantidad suficiente hasta un litro. Después se autoclavó a 121 °C, 15 psi por 15 min. Se enfrió hasta 50 °C y se añadió 100 mg/L de nistatina (Merck, Darmstadt, Alemania)**.

** Se agregó al medio cuando se aisló BAL de la fermentación controlada.

Anexo 2. Elaboración de la curva de crecimiento

En un matraz de 250 mL agregar caldo MRS 50mL

1. Añadir 50 mL de agua destilada o medio de fermentación formulado
2. Autoclavar a 121 °C, 15 psi por 15 min
3. Dejar enfriar
4. Medir un volumen del pre-inóculo de *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 y agregar a los 50 mL del medio.

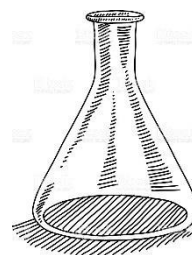
El volumen a agregar será según la siguiente fórmula:

$$(V_{pi})([pi]) = (50 \text{ mL})(10^6 \text{ cel.mL}^{-1})$$

V_{pi} : volumen de pre-inóculo

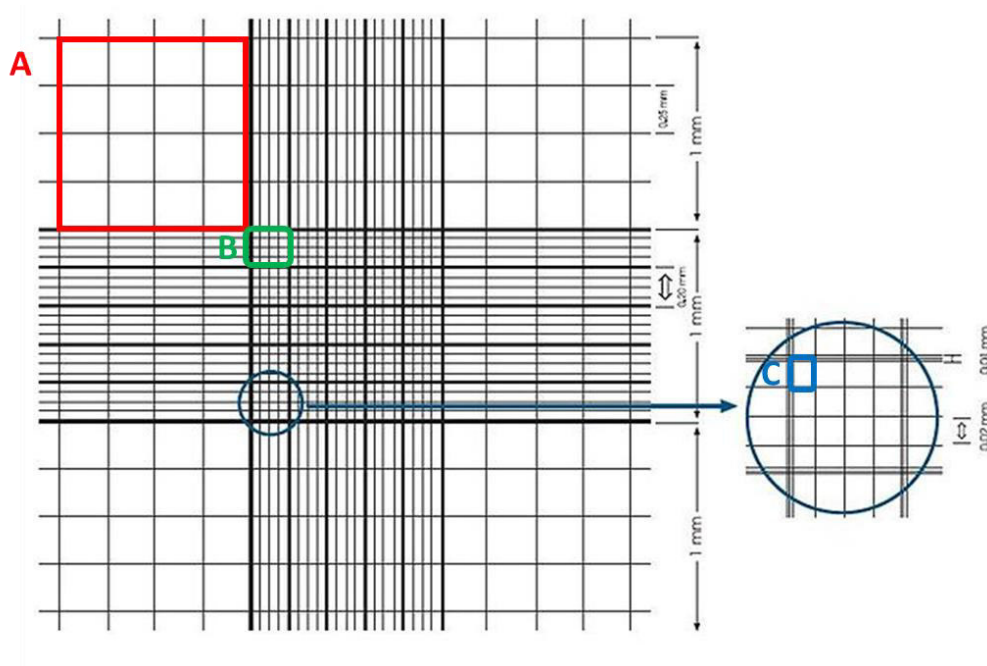
$[pi]$: población del pre-inóculo.

5. Cultivar a 30 °C
6. Tomar muestras cada 2 horas hasta las 24 horas para cuantificar por microscopio y por placas en medio agar MRS.
7. Construir la curva de crecimiento según tiempo vs. Log (cel.mL⁻¹) y Log(UFC.mL⁻¹).



Anexo 3. Cuantificación de células por microscopio usando la cámara de Neubauer

Es una técnica común, rápida y económica que se utiliza para cuantificar células totales por microscopio. En esta tesis se utilizó la cámara de Neubauer con un área de 0,0025 mm² y 0,100 mm de profundidad.



Relación entre los diferentes cuadros:

$$A = 16 B$$

$$B = 25 C$$

Profundidad = 0,1 mm

$$\text{Volumen A} = 1 \times 1 \times 0,1 = 0,1 \text{ mm}^3 = 10^{-4} \text{ mL}$$

$$\text{Volumen B} = 0,25 \times 0,25 \times 0,1 \times 10^{-3} = 6,25 \times 10^{-6} \text{ mL}$$

$$\text{Volumen C} = 0,05 \times 0,05 \times 0,1 \times 10^{-3} = 2,5 \times 10^{-7} \text{ mL}$$

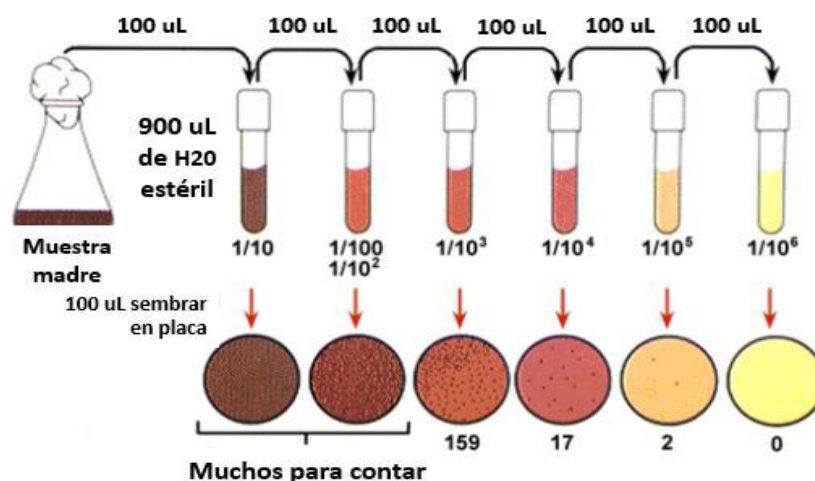
Cálculo:

$$\text{número de células} = \frac{(\text{total de células contadas})}{(\text{número de cuadrados contados}) \times (\text{volumen del cuadro}) \times (\text{dilución})}$$

Anexo 4. Técnica de recuento en placas

Esta técnica consiste en contar el total de colonias formadas en la placa. Cada colonia representa un grupo de células con similares características provenientes de una sola célula. Primero se inicia con un conteo por microscopio y si la concentración es alta se procede a las diluciones seriadas como se observa en el ejemplo. De cada dilución se mide 0,1 mL y se agrega a las placas de agar MRS expandiendo homogéneamente con la ayuda de perlas de vidrio o triangulo de drigalsky.

Ejemplo:



Cálculo:

$$(\# \text{cel contadas})(\text{Fact. dilución})(10) = \text{UFC/mL}$$

Seleccionar las placas que contengan mayor a 30 y menor a 300 UFC y contar las colonias.

Anexo 5. Buffer TBE 10X pH 8

Composición	concentración
• Tris	0,9 M
• Ácido bórico	0,9 M
• EDTA	20 mM

Anexo 6. Acidez Total Titulable (AOAC 2012)

El método se basa en determinar el volumen de NaOH 0,1 N estándar necesario para neutralizar el ácido contenido en la alícuota que se titula, el punto final se considera por el cambio de color del indicador Fenolftaleína al 1% p/V (rosado).

Procedimiento:

1. A 1 mL del caldo de la fermentación ácido láctica controlada del ají “charapita” diluir con 100 mL de agua destilada.
2. Añadir 3 gotas de fenolftaleína al 1%.
3. Valorar con la solución de NaOH 0,1 N hasta obtener la coloración rosada.

Cálculo:

$$\begin{array}{l} \text{Porcentaje de acidez} \\ \text{(expresado en ácido láctico)} \end{array} = \frac{V_g \times N \times \text{Milieq} \times 100}{V_m}$$

V_g Volumen de gasto del NaOH (mL)

N Normalidad de la base (0,1 N)

Milieq 0,09 para ácido láctico

V_m Volumen de muestra (mL)

Anexo 7. Determinación de azúcares reductores (Miller, 1959)

Es una técnica de óxido-reducción que se basa en la capacidad de la glucosa para reducir el ácido 3,5-dinitrosalicílico bajo determinadas condiciones; esta reducción produce una coloración que se hace más intensa a medida que aumenta la concentración de azúcares reductores. Se evidencia por medio de la lectura de la absorbancia en espectrofotómetro, lo que conlleva a la aplicación de la Ley de Beer-Lambert (Miller, 1959).

Reactivo:

Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS): Adicionar 50 mL de agua destilada en un vaso de 250 mL, adicionar 1,6 g de Hidróxido de sodio y disolver mediante agitación continua en plancha magnética a temperatura ambiente. Posteriormente adicionar lentamente 43,8 g de Tartrato de sodio y potasio hasta que se disuelva por completo (es mejor a 60 °C por 10 min). Recubrir el recipiente con papel kraft (con el fin de proteger de la luz) y agregar lentamente 1 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico. Complete con agua destilada hasta 100 mL en balón aforado. Verter la mezcla a un frasco oscuro y dejar agitando durante 12 horas. Filtrar antes de utilizar el reactivo.

Procedimiento:

Las muestras obtenidas de la FAL del ají “charapita” fueron centrifugadas a 10000 RPM por 10 minutos. Después, se mezcló 0,125 mL del sobrenadante con 0,125 mL de DNS. Esta mezcla se calentó a 100 °C por 5 min. Luego, se enfrió sobre hielo por 5 min y posteriormente se adiciona 1,25 mL de agua destilada. Dejar en reposo 15 min. Esta solución es leída a una longitud de onda de 540 nm.

Nota: la ecuación de la curva patrón es una ecuación líneal: $Y = aX + b$

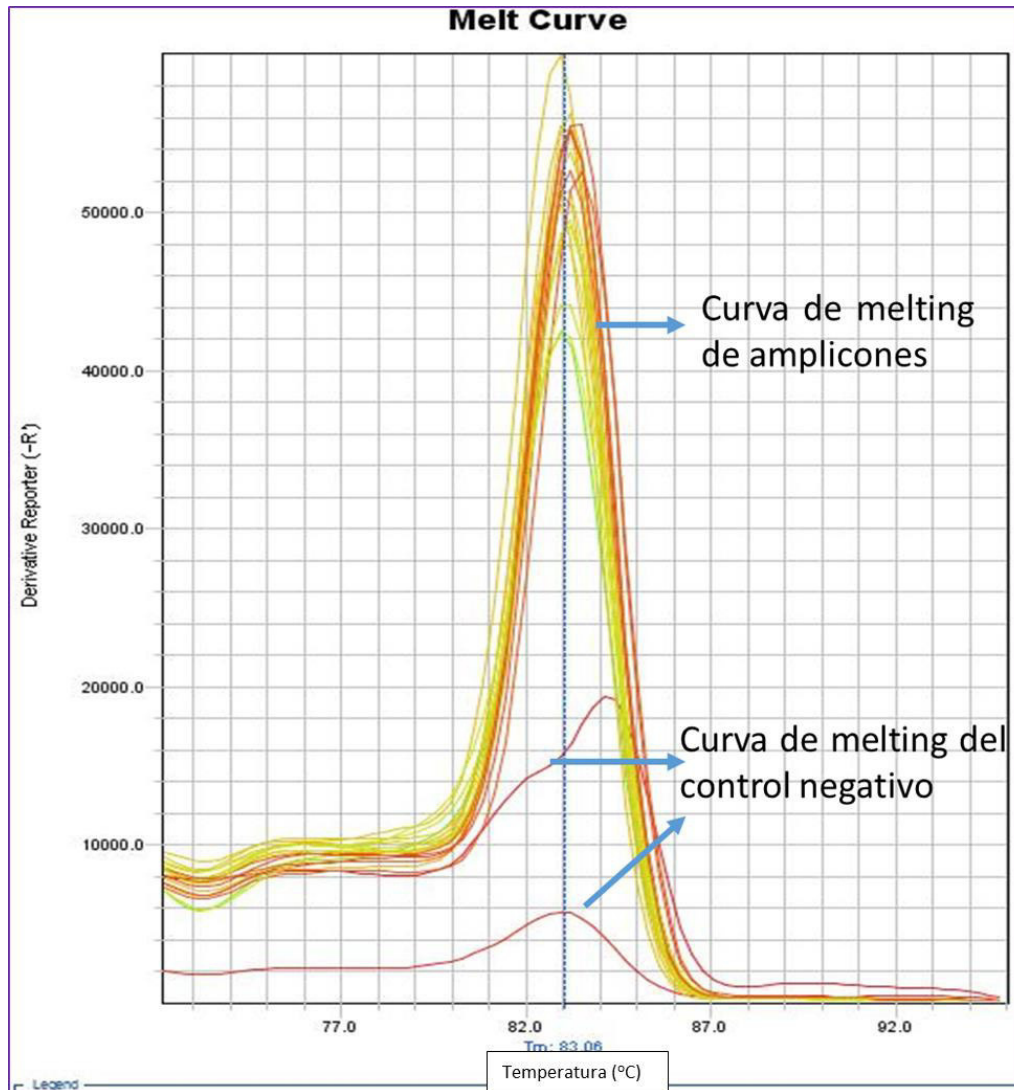
Despejar X para hallar la concentración de azúcar de la muestra problema $X =$

$$\frac{Y-b}{a}$$

Y, Es la Absorbancia hallada de la muestra problema.

10.2 Anexo. Resultado

Anexo 8. Curva de melting de los productos de qPCR

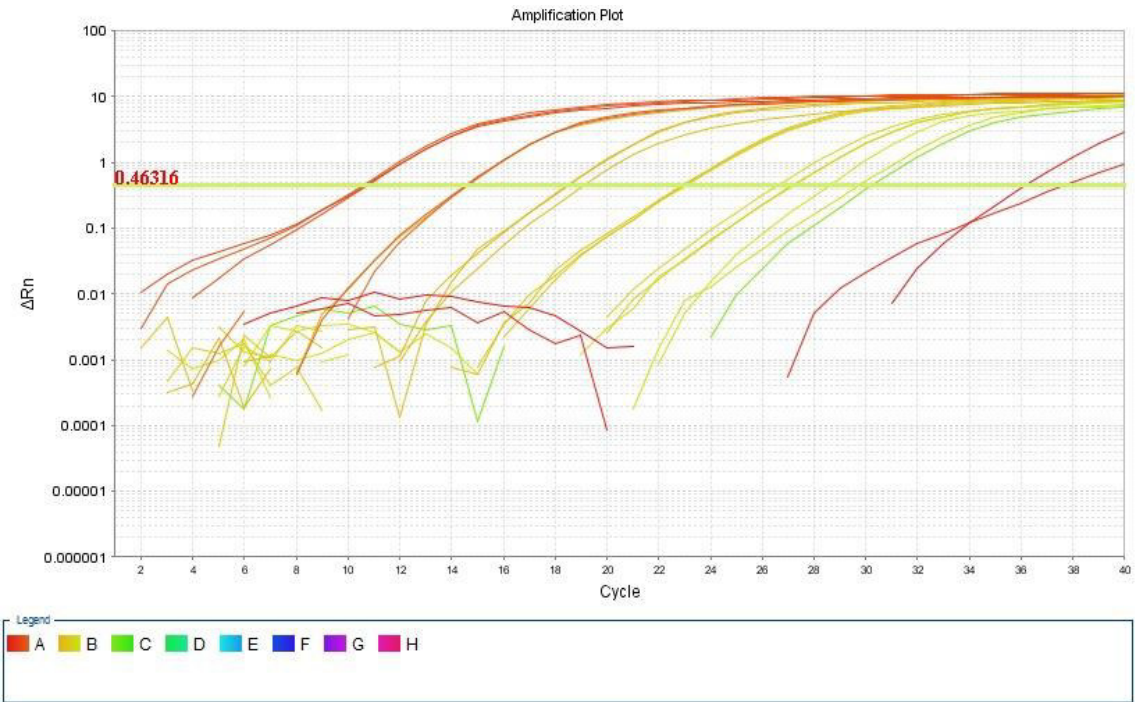


Anexo 9. Análisis fisicoquímicos

Análisis fisicoquímicos	DÍAS						
	0	3	6	12	18	27	37
Azúcares reductores (g/L)	21.65 ± 0.52 ^a	17.17 ± 0.76 ^a	11.32 ± 1.18 ^b	3.92 ± 2.28 ^c	1.8 ± 0.69 ^c	1.2 ± 0.22 ^c	1.02 ± 0.24 ^c
pH	4.74 ± 0.32 ^d	3.24 ± 0.04 ^e	3.17 ± 0.03 ^e	2.96 ± 0.01 ^e	3.14 ± 0.01 ^e	3.13 ± 0.02 ^e	2.88 ± 0.02 ^e
Acidez Total titulable (%;p/v)	0.02 ± 0.00 ^f	0.22 ± 0.03 ^g	0.69 ± 0.06 ^h	1.02 ± 0.04 ⁱ	1.11 ± 0.02 ⁱ	1.03 ± 0.02 ⁱ	1.12 ± 0.04 ⁱ

a, b, c, d, e, f, g, h, i. valores que presentan letras diferente como superíndice son diferentes y estadísticamente significativas

Anexo 10. Curva de amplificación de las diluciones seriadas de ADN de *L. plantarum* ATCC 14917 cultivada en medio MRS



Anexo 11. Curva de amplificación de las diluciones seriadas de ADN de *L. plantarum* ATCC 14917 cultivada en medio de fermentación formulado

